

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR
SEKRETION UND KOMPARTIMENTIERUNG
TYROSINSULFATIERTER PROTEINE**

ANNETTE HILLE

Disbui. München
1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0009

UNTERSUCHUNGEN ZUR SEKRETION UND KOMPARTIMENTIERUNG
TYROSINSULFATIERTER PROTEINE

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät für Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Annette Hille
Heidelberg
im Dezember 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt
Sonderberichterstatter: Prof. Dr. H. Thoenen,
Max-Planck-Institut für
Psychiatrie, Martinsried

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juni 1987

Die vorgelegte Arbeit wurde im Januar 1983 im Labor von Dr. Huttner am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried begonnen, im September 1985 im neuen Labor von Dr. Huttner am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg fortgesetzt und dort im Dezember 1986 abgeschlossen.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hille, A., Rosa, P. und Huttner, W.B. (1984). "Tyrosine sulfation: a post-translational modification of proteins destined for secretion?" FEBS Letters 177, 129-134.

Rosa, P., Hille, A., Lee, R.W.H., Zanini, A., De Camilli, P. und Huttner, W.B. (1985). "Secretogranin I and II: Two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway" J. Cell Biol. 101, 1999-2011.

Die Veröffentlichung der Ergebnisse der Zellfraktionierungsexperimente ist in Vorbereitung

Inhalt

	Zusammenfassung.....	I
	Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV
A	<u>Einleitung</u>	1
A.1	Funktionelle Bedeutung kovalenter Proteinmodifikationen ...	1
A.2	Kompartimentierung der Zelle - intrazellulärer Transport und Sortierung von Proteinen	5
A.3	Export sekretorischer Proteine aus der Zelle.....	8
A.3.1	Translokation von Proteinen in das ER	8
A.3.2	Mechanismus der Sortierung von Proteinen	10
A.4	Sulfatierung von Proteinen	14
A.4.1	Klassifizierung und Nachweis sulfatierter Proteine ..	14
A.4.2	Biosynthese tyrosinsulfatierter Proteine	15
A.4.3	Bisher bekannte tyrosinsulfatierte Proteine	18
A.4.4	Ansätze zur Aufklärung der Funktion der Tyrosin- sulfatgruppe	20
A.5	Fragestellung	22
B	<u>Material und Methoden</u>	24
B.1	Material	24
B.2	Pufferlösungen	26
B.3	Zellkultur.....	26
B.3.1	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Polyornithin...	26
B.3.2	Stammkulturen	27
B.3.3	In vivo-Isotopenmarkierung von Zellkulturen	27
B.3.4	Depolarisationsstimulierte Sekretion aus PC12-Zellen..	28
B.3.4.1	Noradrenalinsekretion	29
B.3.4.2	Sekretion der Sekretogranine	29
B.3.5	Proteinase-Behandlung ganzer Zellen	29
B.4	In vivo-Markierung von Ratten mit (³⁵ S)-Sulfat	30
B.4.1	Markierung und Präparation der Gewebe	30
B.4.2	Homogenisation der Gewebe	30
B.4.3	In vitro-Markierung von Blutplasma der Ratte	30
B.5	Proteinanalytische Methoden	31
B.5.1	Acetonpräzipitation.....	31
B.5.2	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	31
B.5.2.1	SDS-PAGE	31
B.5.2.2	Zweidimensionale PAGE.....	31
B.5.3	Proteinfärbung nach Polyacrylamidgelelektrophorese ..	32
B.5.4	Limitierte Proteolyse	33
B.5.4.1	Limitierte Proteolyse nach Cleveland	33
B.5.4.2	Tryptische Peptidmuster.....	33
B.6	Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen.....	34
B.6.1	Hypotone Lyse der PC12-Zellen	34
B.6.2	Hitzeschritt.....	34
B.6.3	Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel ...	34

B.7	Immunologische Methoden	35
B.7.1	Gewinnung von Antisera	35
B.7.2	Affinitätsreinigung von anti-p45-Immunglobulin	36
B.7.3	Immunoblot-Analyse	37
B.7.4	Dot-Blot	38
B.7.5	Immunpräzipitation mit <u>Staphylococcus aureus</u>	39
B.7.5.1	Vorbehandlung der Staphylococci	39
B.7.5.2	Allgemeines Verfahren der Immunpräzipitation	39
B.7.5.3	Herstellung des Zellextrakts (Tritonextrakts) aus methioninmarkierten PC12-Zellen	39
B.7.5.4	Immunpräzipitation der Sekretogranine aus Rattengewebe	39
B.7.6	Indirekte Immunfluoreszenz in Gewebekulturzellen	40
B.8	Zellfraktionierung	40
B.8.1	Anreicherung integraler Membranproteine durch Detergenzkondensation.....	40
B.8.2	Isotonische Homogenisation von Zellkulturzellen.....	41
B.8.3	Lysosomenpräparation.....	41
B.8.4	Inkubation tyrosinsulfatierter Proteine mit lysosomalen Enzymen.....	42
B.8.5	Differentielle Zentrifugation von Fibroblasten	42
B.8.6	Proteinasebehandlung des PNU.....	42
B.8.7	Messung der Aktivität von Leitenzymen.....	43
B.9	Chemische Analysen.....	44
B.9.1	Proteinbestimmung.....	44
B.9.2	Tyrosinsulfatnachweis.....	44
B.9.2.1	Qualitativer Nachweis tyrosinsulfatierter Proteine in Polyacrylamidgelen.....	44
B.9.2.2	Quantitative Tyrosinsulfatanalyse.....	44
B.9.2.3	Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung	46
B.9.3	Analyse von Peptiden und Aminosäuren auf Zellschichtplatten.....	46
B.10	Detektion und Quantifizierung isotope markierter Substanzen	46
C	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	48
C.1	<u>Spezifische Muster sulfatierter und tyrosinsulfatierter Proteine in Gewebe und Blutplasma der Ratte</u>	48
C.1.1	Fragestellung	48
C.1.2	Ergebnisse.....	50
C.1.2.1	Gewebsspezifität des Sulfateinbaus in Proteine der Ratte	52
C.1.2.2	Die Tyrosinsulfatierung, eine häufige Modifikation sekretorischer Proteine des Blutplasmas.....	54
C.1.2.3	Identifizierung einiger Plasmaproteine	60
C.1.3	Diskussion.....	66
C.1.3.1	Das Fehlen der Tyrosinsulfatierung in Erythrocyten ..	67
C.1.3.2	Die Tyrosinsulfatierung, eine häufige Modifikation sekretorischer Proteine des Blutplasmas.....	68
C.1.3.3	Die Tyrosinsulfatierung, eine kovalente Modifikation sekretorischer Proteine?	73

C.2	<u>Charakterisierung der Sekretogranine aus Ratten-Phäochromocytom-(PC12-)Zellen - ein Modellbeispiel für tyrosinsulfatierte, sekretorische Proteine.....</u>	76
C.2.1	Fragestellung.....	76
C.2.2	Ergebnisse.....	78
C.2.2.1	Sekretogranin I und II, zwei abundante tyrosinsulfatierte Proteine in PC12-Zellen	78
C.2.2.2	Ergebnisse der Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen.....	81
C.2.2.2.1	Homogenisation.....	81
C.2.2.2.2	Hitzeschritt.....	81
C.2.2.2.3	Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel...	86
C.2.2.2.4	Präparative Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen	87
C.2.2.3	Antiseren gegen Sekretogranine aus PC12-Zellen.....	93
C.2.2.3.1	Spezifität der Anti-Sekretogranin-Antiseren.....	93
C.2.2.3.2	Vergleich der Antikörpertiter der Boosterseren...	98
C.2.2.3.3	Kreuzreaktion mit Sekretograninen anderer Species.	99
C.2.2.4	Depolarisationsstimulierte Sekretion von Katecholaminen und Sekretograninen aus PC12-Zellen	100
C.2.2.4.1	Sekretion von Noradrenalin.....	100
C.2.2.4.2	Sekretion der Sekretogranine.....	102
C.2.2.5	Nachweis der Sekretogranine in Hypophyse und Nebenniere	103
C.2.2.5.1	Elektrophoretische Komigration von Sekretogranin I und II aus PC12-Zellen und aus Rindergeweben...	104
C.2.2.5.2	Immunologischer Nachweis von Sekretogranin I, II und Chromogranin A in Ratten- und Rindergeweben ..	107
C.2.2.5.3	Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, drei biochemisch distinkte Proteine.....	111
C.2.2.6	Vorkommen der Sekretogranine in endokrin-sekretorischen Geweben der Ratte.....	117
C.2.3	Diskussion	118
C.2.3.1	Sekretogranin I und II, zwei tyrosinsulfatierte, sekretorische Proteine aus PC12-Zellen	118
C.2.3.2	Diskussion der Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen	120
C.2.3.3	Antiseren gegen Sekretogranine aus PC12-Zellen.....	124
C.2.3.4	Verwendungsmöglichkeiten der gereinigten Sekretogranine und der Anti-Sekretogranin-Antiseren	126
C.2.3.5	Die weite Verbreitung der Sekretogranine in peptidsezernierenden Zelltypen	130
C.2.3.5.1	Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, drei distinkte Proteine.....	130
C.2.3.5.2	Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, eine Familie verwandter Proteine	131
C.2.3.5.3	Mögliche Funktionen der Sekretogranine und	



von Chromogranin A.....	134
C.3 Zellbiologische Untersuchungen zur Sekretion und intrazellulären Lokalisation tyrosinsulfatierter Proteine in Zellkulturen.....	136
C.3.1 Fragestellung.....	136
C.3.2 Ergebnisse.....	138
C.3.2.1 Bilanz der Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats aus Zellkulturen	138
C.3.2.1.1 Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats in Puls-Chase-Experimenten	138
C.3.2.1.2 Akkumulation proteingebundenen Tyrosinsulfats im Zellkulturmedium und in sekretorischen Granula bei Langzeitmarkierung.....	145
C.3.2.2 Tyrosinsulfatierung integraler Membranproteine	151
C.3.2.2.1 Vergleich verschiedener Zelllinien	151
C.3.2.2.2 Charakterisierung der tyrosinsulfatierten Membranproteine aus HepG2-Zellen.....	161
C.3.2.3 Sulfatierung lysosomaler Proteine	166
C.3.2.4 P45, ein nicht-sekretorisches tyrosinsulfatiertes Protein	176
C.3.2.4.1 P45, ein lösliches, in Membranen eingeschlossenes, tyrosinsulfatiertes Protein	177
C.3.2.4.2 Immunocytochemische Lokalisierung von p45	180
C.3.3 Diskussion	185
C.3.3.1 Sekretorische Proteine, die am häufigsten tyrosinsulfatierten Proteine.....	185
C.3.3.2 Tyrosinsulfatierte Membranproteine, Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation.....	189
C.3.3.3 Lysosomale Proteine.....	193
C.3.5.3 Tyrosinsulfatierte, nicht-sekretorische, lösliche Proteine - Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation....	196
D Zusammenfassende Diskussion	199
D.1 Die Tyrosinsulfatierung, eine kovalente Modifikation überwiegend, aber nicht ausschließlich sekretorischer Proteine.....	199
D.2 Mögliche Funktionen der Tyrosinsulfatierung.....	203
Literaturverzeichnis.....	205
Danksagungen.....	217
Lebenslauf.....	218

Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit untersuchte Proteine, die durch Sulfatierung der Aminosäure Tyrosin kovalent modifiziert sind. Ausgehend von der Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase im Golgi-Apparat und von der sekretorischen Natur aller bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine, stellte sich die Frage, ob die Tyrosinsulfatierung allgemein nur in sekretorischen Proteinen oder auch in anderen Proteinklassen vorkommt.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten, daß proteingebundenes Tyrosinsulfat überwiegend in sekretorischen Proteinen vorkommt. Darüberhinaus wurde zum ersten Mal gezeigt, daß nicht-sekretorische Proteine (Membranproteine und lösliche Proteine) in vivo tyrosinsulfatiert werden.

Nach in vivo-Markierung von Ratten mit (^{35}S)-Sulfat wurde Tyrosinsulfat überwiegend in sekretorischen Proteinen des Blutplasmas gefunden. Die Mehrzahl der abundanten Proteine des Blutplasmas waren tyrosinsulfatiert (z.B. α_2 Makroglobulin, α -, β - und γ -Fibrinogen), nicht aber Albumin und Transferrin. Die Gewebe enthielten weitaus weniger proteingebundenes Tyrosinsulfat als das Blutplasma.

Für Sekretogranin I und II, die prominentesten tyrosinsulfatierten Proteinbanden von PC12-Zellen, wurde gezeigt, daß sie nach Depolarisation der Zellen, also auf dem regulierten Weg sezerniert werden. Die Sekretogranine wurden zur Homogenität gereinigt und gegen beide Proteine jeweils spezifische Antiseren gewonnen. In Zusammenarbeit mit Dr. Rosa wurde das Vorkommen der Sekretogranine in einer Vielzahl endokrin-sekretorischer Zelltypen gezeigt, und die Sekretogranine wurden biochemisch und zellbiologisch charakterisiert. Damit

wurden Voraussetzungen geschaffen, um eine mögliche Funktion der Tyrosinsulfatgruppe bei der Sekretion der Sekretogranine zu untersuchen.

Die Bilanz der Sekretion von proteingebundenem Tyrosinsulfat aus verschiedenen Zelllinien zeigte, daß sowohl bei Puls-Chase-Experimenten als auch bei Langzeitmarkierung mit (^{35}S)-Sulfat der überwiegende Teil des proteingebundenen Tyrosinsulfats sekretorisch war. Der Vergleich mit dem Tyrosin- und Gesamtsulfateinbau in sekretorische und zellassozierte Proteine zeigte, daß der hohe Gehalt an Tyrosinsulfat in sekretorischen Proteinen - zumindest im Fall der konstitutiv sezernierenden Zelllinien - nicht durch eine extrem hohe Biosyntheserate der sekretorischen Proteine verursacht war, sondern daß proteingebundenes Tyrosinsulfat in sekretorischen Proteinen tatsächlich angereichert war. Verglichen mit den sekretorischen Proteinen enthielten die zellassozierten Proteine nach Puls-Chase-Markierung geringere, aber signifikante Mengen proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats.

Um die Kompartimentierung der zellassozierten tyrosinsulfatierten Proteine zu untersuchen, wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt. In HepG2-Zellen wurden drei tyrosinsulfatierte Membranproteine beschrieben, (p100, p125 und p150), die aufgrund ihrer Löslichkeit vermutlich integrale Membranproteine darstellen: diese Proteine wurden weder durch hohe Ionenstärke noch durch alkalischen pH, sondern nur durch Detergenz von den Membranen gelöst. Durch Proteasebehandlung intakter Zellen wurde am Beispiel von p150 gezeigt, daß es nicht in der Plasmamembran, sondern in intrazellulären Membranen lokalisiert ist.

In Lysosomen, die in Zusammenarbeit mit Prof. v. Figura untersucht wurden, waren keine für dieses Kompartiment spezifischen tyrosinsulfatierten Proteine nachweisbar.

III

Ein tyrosinsulfatiertes, lösliches Protein (p45), das bisher in Fibroblasten und Hepatomzellen nachgewiesen wurde, war nach Puls-Chase- und Langzeitmarkierung mit (^{35}S)-Sulfat ausschließlich zell-assoziiert. Differentielle Zentrifugation und Untersuchung der Proteasesensitivität zeigten, daß p45 intrazellulär in einem membranumschlossenen Kompartiment lokalisiert ist. Für eine genauere Charakterisierung wurde p45 zur Homogenität gereinigt und spezifische Affinitäts-gereinigte Antikörper gewonnen. Durch immunocytochemische Untersuchungen wurde p45 im rER nachgewiesen. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper soll untersucht werden, ob das im rER nachgewiesene p45 sulfatiert ist, oder ob es als unsulfatierter Precursor für den Transport in ein bisher nicht identifiziertes Zellkompartiment bestimmt ist.

Abkürzungen:

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
β -MSH	β -Merkaptoäthanol
BSA	Rinderserumalbumin
CHOS	an Kohlenhydrate gebundenes Sulfat
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
Ci	Curie
2D	zweidimensional
DEAE...	Diethylaminoethyl...
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F _c	kristallines Fragment von IgG
GSI	Gesamtsulfatinkorporation
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	ImmunglobulinG
IgM	ImmunglobulinM
kD	kilo Dalton
M	molar
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NEPHGE	"non equilibrium pH-gradient elektrophoresis"
N	Niederschlag
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNÜ	Postnukleärer Überstand
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
rER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
ρ	spezifische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	"Signal Recognition Particle"
TCA	Trichloressigsäure
TLE	Dünnschichtelektrophorese ("thin layer elektrophoresis")
TOS	Tyrosin-O-sulfat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Ü	Überstand
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
W	Gewicht

A EINLEITUNG

Die Sulfatierung von Tyrosin in Proteinen ist eine KOVALENTE PROTEINMODIFIKATION, d.h. eine chemische Modifikation einer proteingebundenen Aminosäure durch Einführung einer zusätzlichen funktionellen Gruppe. Man kennt eine Vielzahl solcher kovalenter Modifikationen, die in zunehmendem Maß das Interesse des Proteinbiochemikers auf sich ziehen, da sie die Eigenschaften und Funktionen der Proteine grundlegend verändern können. Die Bedeutung der kovalenten Proteinmodifikationen wird in Abschnitt A.1 erläutert. Da einige Typen kovalenter Proteinmodifikationen - z.B. auch die Sulfatierung - nur in bestimmten Zellkompartimenten auftreten, werden in Abschnitt A.2 und A.3 die wichtigsten Kompartimente der Zelle und die Transportwege von Proteinen zwischen diesen Kompartimenten beschrieben. Abschnitt A.4 faßt den aktuellen Wissensstand über tyrosinsulfatierte Proteine zusammen. Welche Funktion die Tyrosinsulfatgruppe bei Proteinen innehat, ist - von einer Ausnahme abgesehen - bisher nicht bekannt. Daher werden einige methodische Ansätze diskutiert, die zur Klärung dieser Frage beitragen können (s. Abschnitt A.4.4).

A.1 Funktionelle Bedeutung kovalenter Proteinmodifikationen

Proteine erfüllen im Organismus die unterschiedlichsten Funktionen: sie dienen als Enzyme, Regulationsfaktoren, Hormone, Transport- und Strukturproteine, kontraktile Elemente u.a.. Diese Vielfalt der Funktionsbereiche erfordert eine entsprechende Vielzahl spezifisch konstruierter, an die Durchführung der jeweiligen Funktion angepaßter chemischer Strukturen. Grundlage

für diese Vielfalt der Proteinstrukturen sind erstens die variable Reihenfolge der 20 Aminosäuren im Polypeptid (die Aminosäuresequenz) und zweitens kovalente Modifikationen der Aminosäuren (Wold, 1981).

Die genetisch festgelegte Aminosäuresequenz eines Proteins determiniert seine sterische Konformation aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren: infolge nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren sowie in vielen Fällen durch die Ausbildung von Cystinbrücken faltet sich die Polypeptidkette zu einer komplexen, dreidimensionalen Struktur. Dadurch entstehen für die Funktion des Proteins wichtige Domänen: katalytische Zentren oder Bindungsstellen für Coenzyme, Liganden, Proteinuntereinheiten etc. (Übersicht s. Goldberg, 1985).

Häufig stellt jedoch das Polypeptid nur das Grundgerüst eines Proteins dar. Es muß zur Erlangung der vollen Funktionsfähigkeit modifiziert werden, und zwar durch partielle Proteolyse (d.h. durch Abspaltung von Peptiden definierter Länge), durch kovalente Modifikationen von Aminosäureseitenketten oder durch Modifikation des N- bzw. C-Terminus (Wold, 1981).

Auch die kovalenten Proteinmodifikationen sind indirekt durch die genetische Information vorgegeben, da spezifisch nur bestimmte Stellen eines Polypeptids modifiziert werden. Die Spezifität wird durch die beteiligten Enzyme vermittelt, die nur besondere Aminosäuresequenzen - die sogenannten Erkennungssequenzen - oder besondere, durch räumliche Faltung entstandene Domänen modifizieren (Wold, 1981).

Die PARTIELLE PROTEOLYSE ist besonders beim Export sekretorischer Proteine aus der Zelle von Bedeutung (vgl. Abschnitt A.3.1). Ferner werden bestimmte Enzyme durch partielle Proteolyse, die eine Konformationsänderung zur Folge hat, aktiviert (Tabelle A.1A).

Die kovalenten Modifikationen durch EINFÜHRUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN verändern die Eigenschaften der betreffenden Proteine:

- Die Addition zusätzlicher geladener Gruppen (z.B. Phosphat-, Sulfat- oder Sialinsäuregruppen) oder die Neutralisierung geladener Aminosäuren (z.B. durch Carboxymethylierung von Glutaminsäure) können die Konformation eines Proteins und damit seine biologische Aktivität, seine Löslichkeit sowie seine Affinität zu anderen Molekülen verändern (Übersicht s. Wold, 1981).

- Kovalent gebundene Fettsäuren können hydrophile Proteine in Zellmembranen verankern (Schmidt, 1983 und Etges et al., 1986).

- Die kovalente Bindung prosthetischer Gruppen (z.B. Biotin, Retinal) ist für die Funktionsfähigkeit vieler Enzyme erforderlich (Übersicht s. Wold, 1981).

In Tabelle A.1B sind ausgewählte Beispiele kovalenter Modifikationen von Aminosäuren und ihre funktionelle Bedeutung aufgeführt. Darüberhinaus kennt man eine große Zahl weiterer Modifikationen, deren Funktion in vielen Fällen noch ungeklärt ist (Übersicht s. Wold, 1981). Die meisten Aminosäuren können alternativ durch verschiedene funktionelle Gruppen kovalent modifiziert werden. Entsprechend wurden über 120 verschiedene Derivate der 20 proteinogenen Aminosäuren charakterisiert. Lediglich für die Seitenketten von Alanin, Glycin, Isoleucin,

Tabelle A.1: Ausgewählte posttranslationale Modifikationen von Proteinen und ihre funktionelle Bedeutung.

A: PARTIELLE PROTEOLYSE

Beispiel	abgespaltenes Peptid	Lokalisation der modifizierenden Enzyme	Funktion	Literatur
Abspaltung des Signalpeptids sekretorischer Proteine	ca. 20 aminoterminaler, hydrophober Aminosäuren	rER	Teilschritt bei der Translokation sekretorischer Proteine in das ER	Kreil (1981), Walter et al. (1984)
Abspaltung des Propeptids von Trypsinogen	Val-Asp-Asp-Asp-Lys (Rind)	extrazellulär (Lumen des Duodenum)	Aktivierung des Enzyms nach Sekretion in den Verdauungstrakt	Neurath, Walsh (1976)

B: EINFÜHRUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN

Modifikation	Beispiel	modifizierte Aminosäure	Lokalisation der modifizierenden Enzyme	Funktion	Literatur
Acylierung durch Fettsäuren	integrales Plasmamembranprotein von <u>Leishmania</u>	sekundäre Mod. proteingebundener Kohlenhydrate	Golgi-Apparat	Verankerung des Proteins in der Plasmamembran	Etges et al. (1986)
ADP-Ribosylierung	Elongationsfaktor EF2	Histidin	Cytosol	Inhibition der Proteinbiosynthese nach ADP-Ribosylierung von EF2 durch Diphtheriatoxin	Pappenheimer (1977)
γ -Carboxylierung	Prothrombin	Glutaminsäure	rER	Ladung der Carboxylgruppe vermittelt Ca^{2+} -bindung bei der Aktivierung von Prothrombin	Stenflo, Suttie (1977), Brody, Suttie (1984)
Glykosylierung	Plasmaproteine	Asparagin, Serin, Threonin	ER und Golgi-Apparat	terminale Sialinsäure schützt Proteine vor Endocytose und Degradation durch Hepatocyten	Ashwell, Morell (1974)
Hydroxylierung	Kollagen	Lysin, Prolin	ER	Stabilisierung der Konformation der Tripelhelix	Bornstein (1974)
Mannose-6-Phosphorylierung	lysosomale Enzyme	sekundäre Mod. an Asn gebundener Kohlenhydrate	Golgi-Apparat	Erkennungssignal beim Transport der Enzyme in die Lysosomen	Sly, Fisher (1982)
Phosphorylierung	Enzyme des Glykogenstoffwechsels	Serin, Threonin	Cytosol	reversible (In-)Aktivierung der Enzyme	Krebs, Beavo (1979)

Leucin, Methionin und Valin kennt man bisher keine Modifikationen (Wold, 1981).

Nur wenige kovalente Modifikationen werden vor dem Einbau der Aminosäure in das Polypeptid, also prätranslational durchgeführt. Ein Beispiel dafür ist die Formylierung von an tRNA gebundenem Methionin (Blanquet et al., 1984). Meistens werden die Aminosäuren zunächst in die Polypeptidkette eingebaut und erst anschließend modifiziert. Diese Modifikationen bezeichnet man als POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN - unabhängig davon, ob sie an der wachsenden, noch mit dem Ribosom verbundenen Polypeptidkette (eigentlich kotranslational) stattfinden oder am fertig synthetisierten Polypeptid (Wold und Moldave, 1984).

Zusammenfassend läßt sich der Vorgang der Proteinbiosynthese in zwei Schritte unterteilen:

- 1) Translation: Synthese der Polypeptidkette.
- 2) Posttranslationale Modifikationen: Chemische Modifikationen des Polypeptids, die Veränderungen der Struktur bzw. Funktion des Proteins zur Folge haben.

A.2 Kompartimentierung der Zelle - intrazellulärer Transport und Sortierung von Proteinen

Die Zelle ist in Kompartimente aufgeteilt, die unterschiedliche Funktionen erfüllen, und dafür eine spezifische Ausstattung von Proteinen und Enzymen besitzen. So sind, um nur wenige Beispiele zu nennen, die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert, Hydrolasen in Lysosomen und die an der Reifung der

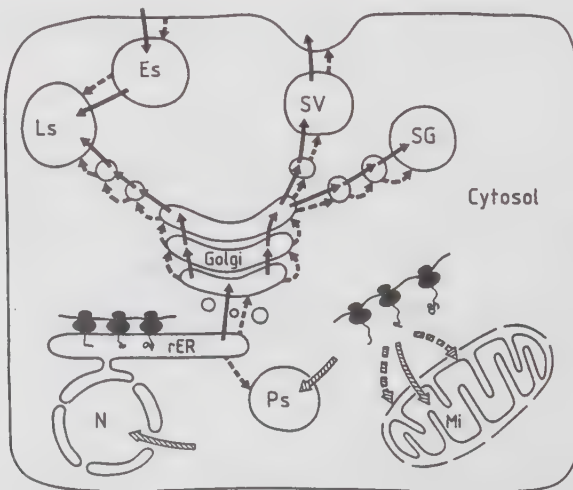
sekretorischen Proteine beteiligten Enzyme (z.B. Signalpeptidase, Glycosyl- und Sulfotransferasen) im ER und/oder Golgi-Apparat.

Nach der Biosynthese, die für fast alle Proteine im Cytoplasma stattfindet, müssen die verschiedenen Proteinklassen auseinander-sortiert und an ihren Bestimmungsort transportiert werden (Abb. A.1) (Übersicht s. Rapoport 1986). Dabei lassen sich zwei Hauptklassen von Proteinen unterscheiden:

1) Für das Cytosol, die Mitochondrien und den Zellkern bestimmte Proteine sowie die löslichen Proteine der Peroxisomen werden an FREIEN POLYSOMEN synthetisiert und POSTTRANSLATIONAL in die entsprechenden Kompartimente transportiert.

Abb. A.1: Intrazellulärer Transport von Proteinen.

Ihrem Biosyntheseort entsprechend können zwei Klassen von Proteinen unterschieden werden: (1) an freien Polysomen synthetisiert werden Proteine des Cytosols, der Mitochondrien (Mi), des Zellkerns (N) und lösliche Proteine der Peroxisomen (Ps); (2) an gebundenen Polysomen des rER synthetisiert werden Proteine des ER, des Golgi-Apparats, der Lysosomen (Ls), der Endosomen (Es), sekretorische Proteine sowie Proteine der Plasmamembran und der Peroxisomenmembran. Die Pfeile zeigen die Transportwege der an freien ($\text{---}\text{>}$) und an gebundenen ($\text{---}\text{>}$) Polysomen synthetisierten Proteine; ausgezogene Pfeile: lösliche Proteine, unterbrochene Pfeile: Membranproteine. (SV): Transportvesikel für den Export konstitutiv sezernierter Proteine; (SG): sekretorische Granula zur Speicherung reguliert sezernierter Proteine (vgl. Abschnitt A.3.2).



2) Proteine des ER, des Golgi-Apparats, der Lysosomen, der Endosomen, der Plasmamembran und Peroxisomenmembran sowie sekretorische Proteine werden von den an das ER GEBUNDENEN POLYSOMEN synthetisiert und KOTRANSLATIONAL in die Membran des rER inseriert (Membranproteine) bzw. in dessen Lumen überführt (lösliche Proteine). Diejenigen Proteine, die nicht direkt für das ER bestimmt sind, werden mit Hilfe von Transportvesikeln durch die Cisternen des Golgi-Apparats hindurch an ihren Bestimmungsort gebracht.

Entsprechend ihrer Verteilung in bestimmte Zellkompartimente erhalten verschiedene Proteinklassen unterschiedliche posttranslationale Modifikationen. Während die Phosphorylierung von Serin und Threonin sowohl in cytosolischen Proteinen, in Proteinen des Zellkerns und der Mitochondrien als auch in sekretorischen Proteinen zu finden ist (Übersicht s. Roach, 1984 und sekretorische Proteine s. Paul und Hynes, 1984 und Rosa et al., 1985b), wurde die Phosphorylierung von Tyrosin bisher nur bei cytosolischen Proteinen und bei Membranproteinen auf der nach dem Cytosol hin orientierten Seite nachgewiesen (Bishop und Varmus, 1982).

Glycosylierungsreaktionen dagegen finden nur im Lumen des ER und Golgi-Apparats statt, cytosolische Proteine werden nicht glycosyliert (Hanover und Lenarz, 1981 und Olden et al., 1982). Demzufolge beschränkt sich das Vorkommen von Glycoproteinen auf ER, Golgi-Apparat und davon abstammende Kompartimente: Kernmembran, sekretorische Vesikel, Plasmamembran, Lysosomen und Endosomen (vgl. Abb. A.1).

Eine extrem spezifische posttranslationale Modifikation ist die Mannose-6-Phosphorylierung lysosomaler Enzyme. Sie findet im Golgi-Apparat statt und spielt eine Rolle beim Transport der Enzyme zum Lysosom (s. Abschnitt A.3.2).

Wie in Abschnitt A.4.2 noch im Detail erläutert wird, findet auch die Sulfatierung von Proteinen im Golgi-Apparat statt.

A.3 Export sekretorischer Proteine aus der Zelle

Bei der vorliegenden Arbeit zur Tyrosinsulfatierung von Proteinen nahm die Untersuchung sekretorischer Proteine eine zentrale Stellung ein. Daher sollen im Folgenden einige Aspekte der Proteinsekretion erläutert werden.

Beim Export sekretorischer Proteine aus der Zelle müssen zwei Dinge geleistet werden:

- 1) Die sekretorischen Proteine müssen vom Cytosol, dem Ort ihrer Biosynthese, durch die umgebende Lipidmembran hindurch in den nicht-cytoplasmatischen Raum transportiert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als TRANSLOKATION (s. Abschnitt A.3.1).
- 2) Auf ihrem Weg aus der Zelle müssen die sekretorischen Proteine von den übrigen Zellproteinen getrennt werden (SORTIERUNG) (s. Abschnitt A.3.2).

A.3.1 Translokation von Proteinen in das ER

Die Translokation von Proteinen in das ER-Lumen findet während ihrer Synthese an den gebundenen Ribosomen des rER, also kotrans-

lational statt (*). Damit haben sekretorische Proteine den nicht-cytoplasmatischen Raum erreicht, der durch Membranfluß mit ihrem Bestimmungsort, der Zelloberfläche, in Verbindung steht. Auf ihrem weiteren Weg durch den Golgi-Apparat in die sekretorischen Vesikel müssen sie keine Membranen mehr passieren. Sie werden wiederholt in Transportvesikel eingeschlossen, die sich vom ER bzw. von den Cisternen des Golgi-Apparats abschnüren, um dann mit dem nachfolgenden Zellkompartiment zu fusionieren (Membranfluß) (Übersicht s. Sabatini et al., 1982).

Der molekulare Mechanismus der Translokation von Proteinen aus dem Cytosol in das Lumen des ER ist in seinen Grundzügen geklärt (Übersicht s. Rapoport, 1986). Es wurde gezeigt, daß alle Proteine, die an den gebundenen Polysomen des rER synthetisiert werden, prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus durch die ER-Membran transloziert werden, d.h., neben den sekretorischen Proteinen auch lysosomale Proteine und Proteine der Plasmamembran.

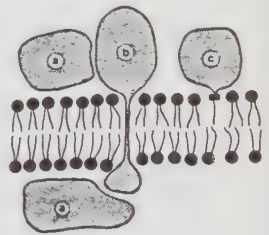
Die Translation der in das ER zu translozierenden Proteine beginnt an frei im Cytosol befindliche Ribosomen. Sobald eine Sequenz von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren - die SIGNALSEQUENZ - an der Oberfläche des Ribosoms exponiert wird, bindet sie an

(*) : Erst kürzlich haben Untersuchungen am Translokationssystem der Hefe gezeigt, daß kleine Proteinmoleküle (α -Faktor mit einem Molekulargewicht von 26 kD) auch posttranslational transloziert werden können, nicht aber größere Proteine wie Invertase. Inwiefern die posttranslationale Translokation bei der Proteinsekretion in vivo von Bedeutung ist, muß noch geklärt werden (Rothblatt und Meyer, 1986 und Waters und Blobel, 1986).

einen Protein-RNA-Komplex, das "Signal Recognition Particle" (SRP). Das SRP tritt mit einem Rezeptor der ER-Membran, dem SRP-Rezeptor oder "Docking Protein" in Wechselwirkung und vermittelt so die Assoziation des Ribosoms mit dem ER. Das wachsende Polypeptid wird über einen im einzelnen nicht geklärten Mechanismus in das Lumen des ER transloziert. In der Regel wird das - meistens N-terminal gelegene - Signalpeptid enzymatisch durch eine Signalpeptidase abgespalten, sodaß sich sekretorische und lysosomale Proteine löslich im Lumen des ER befinden. Integrale Membranproteine dagegen bleiben über die hydrophobe Sequenzen (die in der Regel nicht mit der Signalsequenz identisch sind) in der ER-Membran verankert (s. Abb. A.2).

Abb. A.2: Wechselwirkungen von Proteinen mit Membranen. (nach Alberts et al., 1985b).

Proteine können oberflächlich mit Membranen assoziiert sein (periphere Membranproteine, a) oder mit hydrophoben Segmenten die Membran durchspannen (integrale Membranproteine, b). Bisher sind nur wenige Beispiele von Membranproteinen bekannt, die durch Bindung an Lipide kovalent in der Membran verankert sind (c). Die peripheren Membranproteine interagieren mit der Membran durch nicht kovalente Wechselwirkungen und können unter relativ milden Bedingungen abgelöst werden (hohe Ionenstärke, extreme pH-Werte, Harnstoff). Die Grenzen zwischen peripheren Membranproteinen und löslichen Proteinen sind dabei nicht immer scharf zu definieren. Integrale Membranproteine, deren hydrophober Teil mit der Lipidschicht in Wechselwirkung tritt, können nur durch Detergenzien solubilisiert werden. Dabei wird gleichzeitig die Lipidschicht aufgelöst.



cytoplasmatische
Seite

A.3.2 Mechanismus der Sortierung von Proteinen

Der Prozeß der Aussortierung (Segregation) sekretorischer Proteine von den übrigen Zellproteinen verläuft in mehreren

Stufen. Bereits bei der Translokation in das ER (s. Abschnitt A.3.1) werden Proteine des Cytosols, der Mitochondrien und des Zellkerns ausgeschlossen. Die Trennung der sekretorischen von den lysosomalen Proteinen findet auf dem Weg durch ER und Golgi-Apparat statt. Schließlich müssen noch verschiedene Klassen sekretorischer Proteine auseinandersortiert werden: Manche Proteine werden kontinuierlich, sofort im Anschluß an ihre Biosynthese sezerniert; dazu gehören z.B. viele Proteine des Blutplasmas wie Albumin und Transferrin sowie Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Laminin (nicht regulierte oder KONSTITUTIVE SEKRETION). Andere Proteine, z.B. das Peptidhormon Insulin, werden zunächst intrazellulär in Speichervesikeln (sekretorische Granula) akkumuliert und erst nach Einwirkung eines spezifischen Stimulus sezerniert (stimulierte oder REGULIERTE SEKRETION) (Tartakoff et al., 1978 und Kelly, 1985). Konstitutive Sekretion findet bei allen Zellen statt. Manche Zellen, die zusätzlich Proteine auf dem regulierten Weg sezernieren (s. Tabelle A.2), besitzen mindestens zwei Arten sekretorischer Vesikel. Dementsprechend müssen die verschiedenen sekretorischen Proteine spezifisch in die konstitutiv und reguliert sekretorischen Vesikel verteilt werden. Der molekulare Mechanismus zur Trennung derjenigen Proteine, die ER und Golgi-Apparat durchlaufen, von Proteinen des Cytosols, der Mitochondrien usw. ergibt sich unmittelbar aus dem in Abschnitt A.3.1 geschilderten Prozeß der Proteintranslokation in das ER: Die Translokation ist ein spezifischer Prozeß, d.h., es werden selektiv nur diejenigen Proteine transloziert, die die hydrophobe Signalsequenz besitzen. Diese Signalsequenz wurde bisher bei

allen untersuchten sekretorischen und lysosomalen Proteinen sowie bei Plasmamembranproteinen gefunden, nicht aber bei cytosolischen oder mitochondrialen Proteinen (Übersicht s. Rapoport, 1986).

Tabelle A.2: Konstitutiv und reguliert sezernierende Zelltypen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Zelltyp	Zelllinie	konstitutive Sekretion	regulierte Sekretion	Literatur
Leberzelle	HepG2 = menschliches Hepatom	Plasmaproteine (z.B. Albumin, Komplement C4 und Transferrin)	nicht bekannt	Knowles et al. (1980)
Fibroblast	normale menschliche Hautfibroblasten	Fibronectin	nicht bekannt	Grinnell und Feld (1979)
chromaffine Zellen des Nebennierenmarks	PC12 = Phäochromozytom der Ratte	Laminin ⁽¹⁾	Katecholamine ⁽²⁾ Sekretogranine ⁽³⁾	(1) Schweitzer und Kelly (1989) (2) Greene und Rein (1977) (3) Rosa et al. (1985)
Adrenocorticotrophe Zellen der Hypophyse	AtT20 = Hypophysentumor der Maus	Laminin ⁽⁴⁾	ACTH, Endorphin ⁽⁵⁾	(4) Burgess et al. (1985) (5) Mains et al. (1977)

Den direkten Beweis, daß die Signalsequenz diejenige Struktur ist, welche die Translokation in das ER vermittelt, lieferten gentechnologische Experimente: Deletion der Signalsequenz bei einem Plasmamembranprotein bewirkte die Akkumulation des mutierten Proteins im Cytosol (Spiess und Lodish, 1986). Umgekehrt wurden Gene für Hybridproteine konstruiert, die sich aus einem cytosolischen Protein und einer N-terminalen hydrophoben Signalsequenz zusammensetzten. Ungeachtet der Tatsache, daß der größere Teil des Proteins für das Cytosol bestimmt war, wurden derartig mutierte Proteine vom SRP erkannt und in das ER transloziert (Lingappa et al., 1984).

Über die weiteren Stufen der Proteinsortierung innerhalb des ER und Golgi-Apparats ist wenig bekannt. Lediglich für lysosomale Enzyme wurde eine Signalstruktur beschrieben, die deren selektiven Transport in die Lysosomen vermittelt: Wie in Abschnitt A.2 erwähnt, tragen in vielen Zelltypen die lysosomalen Enzyme Mannose-6-Phosphat als kovalente Proteinmodifikation. Diese Mannose-6-Phosphatgruppe bindet an spezifische, in den Membranen des Golgi-Apparats lokalisierte Rezeptoren, die über einen bisher ungeklärten Mechanismus die Aussortierung der lysosomalen Enzyme vom übrigen Inhalt des Golgi-Apparats bewirken (Sly und Fischer, 1982).

Für den korrekten Transport der verschiedenen Typen sekretorischer Proteine ist bisher kein entsprechendes Sortierungssignal gefunden worden. Dasselbe gilt für die Segregation der Plasmamembranproteine von den Membrankomponenten des Golgi-Apparats oder der Lysosomen.

Bisher ist nicht bekannt, ob jede Proteinklasse ein spezifisches Signal zur aktiven Segregation besitzt, oder ob nach Aussortierung bestimmter Proteinklassen (z.B. lysosomaler und reguliert sekretorischer Proteine) diejenigen Proteine, die übrig bleiben (z.B. konstitutiv sekretorische Proteine), passiv in einen bestimmten Transportweg einfließen ("bulk flow") (Kelly 1985).

Man hat die Möglichkeit diskutiert, daß Kohlenhydratgruppen an der Sortierung sekretorischer Proteine beteiligt sein könnten (Olden et al., 1982), doch liegen dafür keine direkten Beweise vor. In diesem Zusammenhang kommt der Untersuchung posttrans-

ationalen Modifikationen, die spezifisch nur bei einer dieser Proteinklassen gefunden werden, besondere Bedeutung zu (vgl. Fragestellung, Abschnitt A.5).

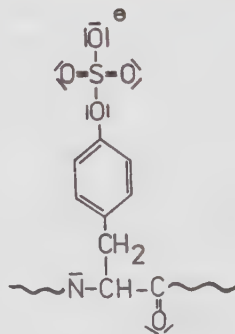
A.4 Sulfatierung von Proteinen

A.4.1 Klassifizierung und Nachweis sulfatierter Proteine

Die Sulfatierung von Proteinen erfolgt durch Veresterung der Sulfatgruppe mit Hydroxylgruppen des Proteins. Bisher wurden zwei Typen der Sulfatesterbindung nachgewiesen:

- a) direkte Bindung an die Aminosäure Tyrosin (Abb. A.3) (Übersicht s. Huttner et al., 1986) und
- b) indirekte Bindung über die Kohlenhydratgruppen von Glycoproteinen und Proteoglycanen. Dabei kann Sulfat an verschiedene Zuckerbausteine binden, z.B. an N-Acetyl-Galactosamin (Parsons und Pierce, 1980 und Green et al., 1985), Neuraminsäure (Schauer, 1985), Glucosamin und Iduronsäure (Übersicht s. Müller und Heilmann, 1984).

Abb. A.3: Chemische Struktur der Tyrosinsulfatesterbindung.

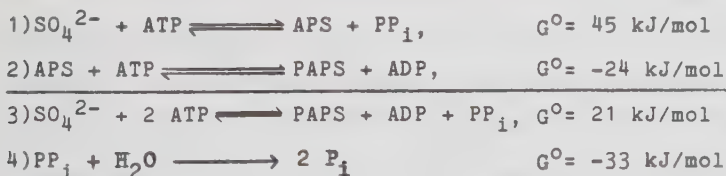


In der vorliegenden Arbeit wurden tyrosin-O-sulfatierte Proteine untersucht. Zum Nachweis von Tyrosinsulfat in Proteinen wurden Zellkulturen oder Gewebe in vivo mit (³⁵S)-Sulfat markiert. Dabei werden stets auch am Kohlenhydrat sulfatierte Proteine markiert, die jedoch bezüglich der Natur ihrer Sulfatesterbindung

nicht näher analysiert wurden. Dagegen wurde die modifizierte Aminosäure Tyrosinsulfat nach alkalischer Hydrolyse der jeweiligen Proteinproben durch Dünnschichtelektrophorese identifiziert und quantifiziert.

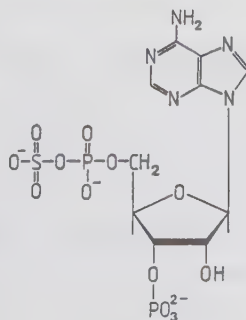
A.4.2 Biosynthese tyrosinsulfatierter Proteine

Die Sulfatierung von Proteinen ist eine enzymkatalysierte Reaktion. Die beteiligten Enzyme (Sulfotransferasen) können anorganisches Sulfat nicht direkt auf Proteine übertragen, sondern benötigen wie Proteinkinasen oder Glycosyltransferasen ein aktiviertes Cosubstrat. Dieser SULFATDONOR ist das Nukleotid 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS, s. Abb. A.4) (für die Tyrosinsulfatierung gezeigt durch Lee und Huttner, 1983). Die Biosynthese von PAPS erfolgt durch eine zweistufige, enzymkatalysierte Reaktion (Robbins, 1962):



Die Bildung von PAPS (Gleichung 1-3) ist endergonisch und wird durch die Hydrolyse des Pyrophosphats angetrieben (Gleichung 4). Durch die Säureanhydridbindung erhält die Sulfatgruppe im PAPS ein Gruppenübertragungspotential von 7,6 kJ/mol.

Abb. A.4: Das aktivierte Sulfat
3'-Phosphoadenosin-5'-phosphogulfat
(PAPS), das Kosubstrat bei der
Sulfatierung von Proteinen.



Die Sulfatierung von Proteinen an Tyrosin verläuft nach folgender Reaktionsgleichung:



Bisher wurden noch keine Proteinsulfotransferasen zur Homogenität gereinigt, doch lassen sich in Zellhomogenaten Enzymaktivitäten unterscheiden, die Proteine bevorzugt an Kohlenhydratgruppen oder am Tyrosin sulfatieren (Lee und Huttner, unveröffentlicht). Deshalb wurde die Existenz mehrerer Proteinsulfotransferasen mit unterschiedlicher Substratspezifität postuliert. Ein membrangebundenes Enzym, das Proteine an Tyrosin sulfatiert, die TYROSYL-PROTEINSULFOTRANSFERASE, wurde erstmals in PC12-Zellen beschrieben (Lee und Huttner, 1983) und aus der Nebenniere des Rinds partiell gereinigt und charakterisiert (Lee und Huttner, 1985). Mehrere Beobachtungen zeigen, daß die Tyrosylproteinsulfotransferase(n) überwiegend, wenn nicht ausschließlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist:

Die Tyrosylproteinsulfotransferase aus Rindernebennierenmark zeigte bei Zellfraktionierungsexperimenten eine ähnliche Verteilung im Saccharosedichtegradienten wie das Golgi-Leitenzym Galactosyltransferase (Lee und Huttner, 1985). In anderen Zellkompartimenten war mit dem verwendeten Enzymtest keine Tyrosylproteinsulfotransferaseaktivität nachweisbar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß weitere Tyrosylproteinsulfotransferasen existieren, deren Aktivität andere Bedingungen im Enzymtest erfordert (z.B. zusätzliche Cofaktoren).

Eine mit der Zellfraktionierung übereinstimmende Aussage lieferte die Lokalisierung sulfatierter Makromoleküle in Geweben durch elektronenmikroskopische Autoradiographie: Nach Markierung von Mäusen und Ratten mit anorganischem (^{35}S)-Sulfat und Autoradiographie elektronenmikroskopischer Dünnschnitte war bei 14 verschiedenen Zelltypen der Einbau von Sulfat in fixierbare

Moleküle ausschließlich im Golgi-Apparat und in sekretorischen Vesikeln nachweisbar (Lane et al., 1964 und Young, 1973). Diese Methode erfaßt sowohl die Sulfatierung von Tyrosin als auch die von Kohlenhydraten. Da in manchen Geweben die Sulfatierung von Kohlenhydraten 10- bis 100-mal häufiger vorkommt als die Sulfatierung von Tyrosin (vgl. Abb. C.4), läßt sich anhand der elektronenmikroskopischen Daten nicht ausschließen, daß tyrosinsulfatierte Proteine auch in anderen Kompartimenten vorkommen, daß ihre Menge jedoch unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lag.

Die übereinstimmende Aussage der beiden unabhängigen Ansätze deutet auf eine zumindestens überwiegende Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase(n) im Golgi-Apparat hin.

Anhand eines sekretorischen, tyrosinsulfatierten Modellproteins, des IgM, konnte die Lokalisation einer Tyrosylproteinsulfotransferaseaktivität im Golgi-Apparat näher eingegrenzt werden (Bäuerle und Huttner, 1987). Durch Puls-Chase-Markierung von Hybridomazellen mit Galactose und Sulfat sowie durch Analyse der Sialidaseempfindlichkeit des sulfatmarkierten IgM wurde gezeigt, daß die Tyrosinsulfatierung im selben Kompartiment wie der Transfer von Galactose und Sialinsäure stattfindet, d.h. im trans-Golgi-Apparat (*) (s. Tabelle A.3). Die Sulfatierung des IgM findet demnach gleichzeitig oder unmittelbar nach dem Transfer der terminalen Kohlenhydrate statt.

(*): Als trans-Golgi-Apparat werden die distalen Zisternen des Golgi-Apparats bezeichnet, an denen sekretorische Vesikel und vermutlich auch die Transportvesikel für lysosomale Enzyme gebildet werden (Übersicht s. Rothman, 1985).

Tabelle A.3: Zeitliche Abfolge von Proteinbiosynthese und kovalenten Proteinmodifikationen im rER und Golgi-Apparat.

Kompartiment	Biosyntheseschritt	experimenteller Nachweis	Transportdauer
rER	Polypeptidsynthese	Einbau radioaktiver Aminosäuren	10 min
	Hydrolyse des Signalpeptids		
	N-Glycosylierung (O-Glycosylierung?)	^3H -Mannose-Einbau	
Golgi-Apparat:			30-60 min
cis	Prozessierung der mannose-reichen Kohlenhydrate		
medial		Endo-H-Resistenz	
	Fucosylierung		
	O-Glycosylierung		
trans	Fucosylierung	^3H -Fucose-Einbau	
	Galactosylierung	^3H -Galactose-Einbau	
	Sialylierung	Sialidasensitivität	
	Sulfatierung (Kohlenhydrate und Tyrosin)	^{35}S -Sulfat-Einbau	

A.4.3 Bisher bekannte tyrosinsulfatierte Proteine

Die Sulfatierung eines Proteins am Tyrosin wurde erstmals für das Fibrinopeptid B beschrieben (Bettelheim, 1954). Außer im Fibrinopeptid B wurde Tyrosinsulfat bis 1982 nur in einigen Peptidhormonen (Cholecystokinin, Gastrin, Leu-Enkephalin, Caerulein und Phyllokinin) und im Hirudin gefunden (Mutt und Jorpes, 1968; Gregory et al., 1964; Unsworth et al., 1982; Anastasi et al., 1968; Anastasi et al., 1966 und Petersen et al., 1976). Erst 1982 wurde gezeigt, daß Tyrosinsulfat in Geweben der Ratte eine weitverbreitete Proteinmodifikation ist, die in Proteinen aller Molekulargewichtsbereiche vorkommt (Huttner, 1982). Seither wurden tyrosinsulfatierte Proteine in allen untersuchten vielzelligen Organismen gefunden: in der Grünalge Volvox carteri (Sumper und Huttner, unveröffentlicht und Wenzel und Sumper, 1986), in Mollusken (Wegschnecke) (Bäuerle und Huttner, unveröffentlicht), in Drosophila melanogaster (Bäuerle und Huttner, 1985) und in Vertebraten (vgl. Tabelle A.4). Die

Tabelle A.4: Bisher bekannte tyrosinsulfatierte Proteine.

s sind nur die Proteine aufgeführt, deren Funktion bzw. zellbiologische Eigenschaften charakterisiert sind. Darüberhinaus kennt man in den verschiedensten Geweben und Organismen eine Vielzahl tyrosinsulfatierter Proteinbanden, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Protein	Species	Sekretion (*)	Literatur
Alpha ₂ -Antiplasmin	Mensch	K	Hortin, Fok (1986b)
Alpha-Fötoprotein	Mensch	K	Liu et al. (1985)
Alpha ₂ -Makroglobulin	Ratte	K	Hille et al. (1984)
Plutgerinnungsfaktor X	Rind	K	Morita, Jackson (1986)
Serulein	Frosch	R	Anastasi et al. (1968)
Cholecystokinin	Schwein	R	Mutt, Jorpes (1968)
-terminales Peptid des Cholecystokininprecursors	Ratte	R	Adrian et al. (1986), Eng et al. (1986)
Sermatansulfat (Proteinteil)	Mensch	K	Kresse et al. (unveröffentlicht)
Antactin/Nidogen	Maus	K	Paulsson et al. (1985)
Fibrinogen (8-Kette)	Hund, Katze, Pferd, Rind, Schaf, Schwein...	K	Bettelheim (1954), Übersicht: Dayhoff (1972)
Fibrinogen (γ-Kette)	Ratte	K	Hille et al. (1984)
Transferrin	Hamster, Mensch, Ratte	K	Paul, Hynes (1984), Liu et al. (1985)
Insulin	Hund, Maus, Mensch, Ratte, Schwein	R	Gregory et al. (1964), Übersicht: Andersen (1985)
Thrombin	Blutegel	R	Petersen et al. (1976)
Immunoglobulin A (κ-Kette)	Maus	K	Bäuerle, Huttner (unveröffentlicht)
Immunoglobulin G 2a (γ-Kette) (5)	Maus	K	Bäuerle, Huttner (1984)
Immunoglobulin M (μ-Kette)	Maus, Ratte	K	Bäuerle, Huttner (unveröffentlicht)
Complement C4 (κ-Kette)	Mensch, Maus	K	Karp (1983), Hortin et al. (1986 a)
Neu-Enkephalin	Maus, Meerschweinchen, Ratte, Schaf	R	Unsworth et al. (1982)
Neurokinin	Frosch	R	Anastasi et al. (1966)
Kollagen Typ III	Mensch	K	Jukkola et al. (1986)
Kollagen Typ V	Huhn	K	Fessler et al. (1986)
Secretogranin I	Ratte, Rind	R	Lee, Huttner (1983), Rosa et al. (1985a,b)
Secretogranin II	Ratte, Rind	R	Lee, Huttner (1983), Rosa et al. (1985a,b)
SP70 (Glycoprotein der extrazellulären Matrix)	Volvox	K	Wenzel, Sumper (1986)
Protein/Vitronectin	Mensch	K	Hille, Jenne, Stanley und Huttner (unveröffentlicht)
Myoelglobulin	Schwein	K	Herzog (1985)
Stellogenin 1,2 und 3	Drosophila	K	Bäuerle, Huttner (1985)

(*) : Nur nach Tunicamycinbehandlung einer Hybridomzelllinie

(*) : K = konstitutiv, R = reguliert

modifiziert nach Huttner und Bäuerle, 1987)

bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine mit bekannten Funktionen sind in Tabelle A.4 zusammengefaßt. Es handelt sich dabei ausschließlich um sekretorische Proteine. Ihrer Funktion nach können sie verschiedenen Klassen zugeordnet werden: an der Blutgerinnung beteiligte Proteine, Peptidhormone und Neuropeptide, Proteine des Immunsystems, Proteine der extrazellulären Matrix, Plasmaproteine und Speicherproteine.

A.4.4 Ansätze zur Aufklärung der Funktion der Tyrosinsulfatgruppe

Die biologische Funktion der Tyrosinsulfatierung konnte bisher nur für das Peptidhormon Cholecystokinin geklärt werden: die Tyrosinsulfatgruppe ist für die Wirkung des Cholecystokinins als Gastrointestinalhormon wichtig (Bodanszky et al., 1978). Desulfatiertes Cholecystokinin wirkt dagegen als Opiat-Antagonist (Schiller et al., 1978).

Bei den übrigen tyrosinsulfatierten Proteinen ist über die Funktion der Sulfatgruppe bisher nichts bekannt. Eine Beteiligung der Sulfatgruppe an der reversiblen Regulation von Enzymaktivitäten ist wenig wahrscheinlich, da die Tyrosinsulfatierung - im Gegensatz beispielsweise zur Phosphorylierung - vermutlich irreversibel ist (Blombäck et al., 1960 und Huttner, unveröffentlicht). Die Sulfatgruppe könnte mehrere unterschiedliche Funktionen erfüllen, indem sie wie im Fall des Cholecystokinin die biologische Aktivität verschiedener tyrosinsulfatierter Proteine beeinflußt. Andererseits könnte die Tyrosinsulfatierung bei verschiedenen Proteinen jeweils die gleiche Funktion ausüben, die mit einer gemeinsamen Eigenschaft dieser Proteine zusammenhängt: alle bisher bekannten tyrosinsulfatierten Proteine sind sekretorisch, daher könnte die

Tyrosinsulfatgruppe beispielsweise den Prozeß der Sekretion dieser Proteine beeinflussen (Huttner et al., 1986).

Um die Funktion der Tyrosinsulfatierung zu klären, gibt es folgende experimentelle Ansätze:

- 1) UNTERSUCHUNG VON MODELLPROTEINEN, um festzustellen, wie die Sulfatierung deren Funktionen beeinflußt. Solche Untersuchungen sind bisher nur für Peptidhormone durchgeführt worden (s.o.).
- 2) CHARAKTERISIERUNG DER TYROSYLPROTEINSULFOTRANSFERASE und ihrer Regulation. Auf diesem Wege gefundene Inhibitoren der Transferase könnten, in vivo eingesetzt, zur Aufklärung der Funktion der Tyrosinsulfatierung beitragen.
- 3) GEZIELTE PUNKTMUTATIONEN im Gen tyrosinsulfatierter Proteine. Um das Codon für das sulfatierte Tyrosin so zu verändern, daß das mutierte Protein nicht sulfatiert wird, kann Tyrosin ersetzt werden durch die chemisch ähnliche Aminosäure Phenylalanin, die keine Hydroxylgruppe besitzt. Nach Expression des mutierten Gens in Zellkulturen könnte dann untersucht werden, ob das Fehlen der Tyrosinsulfatierung beispielsweise die Sekretion des Proteins beeinflußt (Huttner et al., 1986).
- 4) UNTERSUCHUNG DER INTRAZELLULÄREN KOMPARTIMENTIERUNG TYROSIN-SULFATIERTER PROTEINE. Die Liste der bisher bekannten tyrosinsulfatierten Proteine ist begrenzt, und die Untersuchung weiterer Modellproteine aus verschiedenen Zellkompartimenten oder Proteinklassen bleibt immer eine willkürliche, nicht notwendigerweise repräsentative Auswahl. Nur die Analyse des gesamten Proteinspektrums verschiedener Zellkompartimente im Vergleich mit sekretorischen Flüssigkeiten kann klären, ob die Tyrosinsulfatierung generell auf sekretorische Proteine beschränkt ist oder ob tyrosinsulfatierte Proteine auch in anderen Zellkompartimenten vorkommen. Letzteres würde bedeuten, daß die Tyrosinsulfatierung neben einer möglichen Rolle bei der

Proteinsekretion weitere Funktionen besitzen muß, die für verschiedene Proteine oder Proteinklassen spezifisch sein können.

A.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die intrazelluläre Kompartimentierung tyrosinsulfatierter Proteine (vgl. Abschnitt A.4.4(4)).

Ausgehend von der Beobachtung, daß alle bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine sekretorisch sind (Tabelle A.4), und von der Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase im Golgi-Apparat (vgl. Abschnitt A.4.2) stellten sich folgende Fragen:

- 1) Ist die Tyrosinsulfatierung von Proteinen beschränkt auf die vom Golgi-Apparat abgeleiteten Zellkompartimente, also auf sekretorische Vesikel, Plasmamembran, Lysosomen und Endosomen (vgl. Abb. A.1)?
- 2) Kommen tyrosinsulfatierte Proteine in allen vom Golgi-Apparat abgeleiteten Kompartimenten vor, oder beschränkt sich diese Modifikation - ähnlich der Mannose-6-Phosphorylierung lysosomaler Enzyme (vgl. Abschnitt A.2) - auf eine spezifische Proteinklasse, beispielsweise auf die der sekretorischen Proteine?
- 3) Lösliche und für den Export zur Plasmamembran bestimmte Proteine werden vermutlich in denselben Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert (Strous et al., 1983). Beide Proteinklassen müssen also auf ihrem Weg zur Plasmamembran die Tyrosylproteinsulfotransferase passieren. Sulfatiert die Tyrosylproteinsulfotransferase selektiv nur die löslichen, sekretorischen Proteine oder nimmt sie auch Plasmamembranproteine als

Substrat an?

Als Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende methodische Ansätze verfolgt:

1) Untersuchungen am Gesamtorganismus: Ratten wurden in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert und der Tyrosinsulfatgehalt in Proteinen verschiedener Gewebe und der Blutzellen mit dem Tyrosinsulfatgehalt der in das Blutplasma sezernierten Proteine verglichen.

2) Untersuchung zweier Modellproteine aus Gewebekulturen: Es konnte gezeigt werden, daß die zwei prominenten tyrosinsulfatierten Proteine aus PC12-Zellen, Sekretogranin I und II, sekretorische Proteine sind.

3) Zellfraktionierung: Nach Puls-Chase- und Langzeitmarkierung von Zellkulturen mit (^{35}S)-Sulfat wurde der Tyrosinsulfatgehalt sezernierter und zellulärer Proteine verglichen. Membranproteine und lysosomale Proteine wurden auf ihren Tyrosinsulfatgehalt hin untersucht.

B Material und Methoden

B.1 Material

Isotopenmarkierte Substanzen

Alle isotopenmarkierten Substanzen waren entweder von NEN (Dreieich) oder von Amersham (Braunschweig).

Na¹²⁵J: 17 Ci/mg (NEZ-033L, NEN)

(³⁵S)-Methionin: 1160 Ci/mmol (SJ.1515, Amersham)

L-(Ring-2,5,6-³H)-Noradrenalin: 43,9 Ci/mmol (NET-678, NEN)

(³²P)-Phosphat: 900-1100 mCi/mmol (PBS.41, Amersham)

(¹²⁵J)-Protein A: 2-10 Ci/g (NEX-146L, NEN)

(³⁵S)-Sulfat: trägerfrei, a)25-40 Ci/mg (SJS.1, Amersham)
b)30-43 Ci/mg (NEX-042, NEN)

L-(Ring-3,5-³H)-Tyrosin: 40-60 Ci/mmol (NET-127, NEN)

UDP-D-(6-³H)-Galactose: 5-20Ci/mmol (TRK.513, Amersham)

Zellkulturchemikalien

Zellkulturplastik (Kulturflaschen, Petrischalen) waren von Nunc (Wiesbaden) oder Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg).

Zellkulturmedien (DMEM, MEM) waren von Boehringer (Mannheim) oder Gibco (Eggenstein), Aminosäuren in Pulverform von Sigma (Deisenhofen), Aminosäure- und Vitaminstammlösungen von Boehringer oder Gibco.

Fötale Kälberserum war von Boehringer oder Gibco, Pferdeserum von Gibco.

Polyornithin und Antibiotika waren von Sigma, sterile Trypsin-EDTA-Stammlösung von Seromed (Biochrom KG, Berlin).

Immunochemikalien

Antiseren (Ziegen-Anti-Ratten-Fibrinogen, Cappelkatalog 0113-0821; Ziegen-Anti-Ratten-C3, Cappelkatalog 0113-0601 und Kaninchen-Anti-Ratten-Transferrin, Cappelkatalog 0113-1442) waren von Dynatech (Denkendorf).

Durch Ammoniumsulfatpräzipitation angereichertes Kaninchen-Präimmun-IgG wurde von Dr.P.Rosa in unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Freundsches Adjuvans (komplett und inkomplett) war von Gibco.

Pansorbin^R war von Calbiochem (Frankfurt).

Enzyme und Proteine

Molekulargewichtsstandards für die SDS-PAGE waren von Pharmacia (Freiburg) (niedermolekulare Proteine, 14,4-97 kD) und von Sigma (hochmolekulare Proteine, 29-205 kD).

Pronase aus Streptomyces griseus und Proteinase K aus Tritirachium album waren von Boehringer, Trypsin-TPCK von Worthington (Interchem, München) und V8-Protease aus Staphylococcus aureus von Miles (München).

Angereichertes Contact-Site A-Protein aus Dictyostelium wurde von P. Hohmann (Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Chromaffine Granula (Präparation s. Rosa et al., 1985b) wurden von Dr. P. Rosa zur Verfügung gestellt.

Materialien für Elektrophorese und Chromatographie

Acrylamid, Bisacrylamid, SDS und N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-diamin waren von Serva (Heidelberg), die Ampholyte für die IEF von LKB (Gräfelfing).

DEAE-Sephacel und Cyanbromid-aktivierte Sepharose-4B waren von Pharmacia.

Nitrocellulose (BA 83, 0,2 µm Porengröße) und Zellulose-Dünnschichtplatten (Cellulose Avicel, F1440) waren von Schleicher und Schüll (Dassel).

Amidoschwarz und BioRad-Lösung zur Proteinbestimmung nach Bradford waren von BioRad (München), Bromphenolblau, Coomassie Blau und Ponceau S waren von Serva, Ninhydrin von Merck (Darmstadt).

Feinchemikalien

Heparin und Procain-HCl waren von Serva.

p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid und p-Nitrocatecholsulfat waren von Sigma.

Tyrosin-O-Sulfat wurde von P.A. Bäuerle in unserem Labor synthetisiert.

Sonstiges

Aqualuma war von Lumac (Schaesberg, Niederlande).

Alle übrigen Substanzen (Salze, Lösungsmittel, Detergenzien und Puffersubstanzen) waren in der Regel analysereine Substanzen bzw. von der höchsten verfügbaren Reinheit von Merck, Roth (Karlsruhe), Serva oder Sigma.

Zellininen

AtT20-Zellen wurden mir von Dr. Gumbiner (San Francisco), A431-Zellen von Dr. Wehlant (Göttingen), HepG2-Zellen von Dr. Bauer (Salzburg), Ltk⁺-Zellen von Dr. Fritz (Martinsried), menschliche Hautfibroblasten von Prof. v. Figura (Münster) und Prof. Cantz (Heidelberg) und PC12-Zellen von Prof. Thoenen (Martinsried) überlassen.

Tiere

Die Kaninchen für die Immunisierung waren weiße Neuseeländer (Fa. Ivanovas, München) oder Bastarde (Züchtung MPI für Biochemie in Martinsried).

Keimfreie Ratten wurden vom Zentralinstitut für Versuchstiere (Hannover) bezogen.

Whistar-Ratten waren aus der Züchtung des MPI für Biochemie (Martinsried).

B.2 Pufferlösungen

Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 5 mM β -MSH, 0,1 mM PMSF, pH 7,5

Puffer B: 20 mM MES-NaOH, 5 mM β -MSH, pH 6,0

Puffer C: 50 mM Tris-HCl, 0,5% TritonX-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02% NaN_3 , pH 7,4

Puffer D: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4

SDS-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, 3% SDS, 10% Glycerin, pH 6,8

SDS-Probenpuffer: SDS-Puffer mit 3,3% β -MSH

PBS: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KH_2PO_4

Ca-Mg-PBS: PBS mit 0,9 mM CaCl_2 und 0,5 mM MgCl_2

DPBS: PBS ohne NaH_2PO_4 , mit 0,1 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l CaCl_2

Earle's BSS: 0,265 g/l CaCl_2 , 1,1 g/l Glucose, 0,4 g/l KCl, 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,14 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 6,8 g/l NaCl, 3,7 g/l NaHCO_3 , 10,6 mg/l Phenolrot

B.3 ZellkulturB.3.1 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Polyornithin

Die Plastikschalen wurden über Nacht bei RT mit steriler Polyornithinlösung (1 mg/ml in 150 mM Borat-NaOH-Puffer, pH 8,2) inkubiert und anschließend zweimal mit sterilem, destilliertem Wasser gespült.

B.3.2 Stammkulturen

Primärkultur von Nebennierenmarkszellen des Rinds

Chromaffine Zellen wurden von Dr. Acheson und Dr. Saadat (Martinsried) zur Verfügung gestellt und auf polyornithinbeschichteten Plastikschaalen kultiviert (Acheson et al., 1984).

Sekundärkultur etablierter Zelllinien

AtT20-Zellen (Mains et al., 1977), A431-Zellen (Chinkers et al., 1979), HepG2-Zellen (Aden et al., 1979), Ltk⁻-Zellen (Kit et al., 1963), menschliche Hautfibroblasten (Sly und Grubb, 1979) und PC12-Zellen (Greene und Tischler, 1976) wurden in Plastik-Gewebekulturflaschen gehalten. Die Zusammensetzung der Medien und die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle B.1 aufgeführt. Die Zellen wurden in CO₂-Inkubatoren mit feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die AtT20- und PC12-Zellen mit Medium von der Kulturschale abgespült, alle anderen Zelltypen wurden mit 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA abgelöst. Die Zellen wurden sedimentiert, durch Resuspendieren mit einer eng abgeschmolzenen Pasteurpipette vereinzelt und 1/5 (menschliche Hautfibroblasten, PC12-Zellen) bzw. 1/10 (alle übrigen Zelllinien) verdünnt.

Tabelle B.1: Nährmedien für die Anzucht sekundärer Zelllinien.

Zellstamm	Kulturmedium	Variante		Zusätze			Atmosphäre (%CO ₂)
		Glc (g/l)	Gln (mM)	NaHCO ₃ (g/l)	Serum	sonstige	
AtT20	DMEM	4,5	8	3,7	10% PS	0,0035% AMSH	10
A431	DMEM	1,1	4	3,7	15% FKS	n.e. AS	10
HepG2	DMEM	4,5	8	3,7	10% FKS		10
LTK ⁻	DMEM	1,1	4	3,7	10% FKS		10
menschliche Hautfibroblasten	MEM (Earle's Salze)	1,1	2	2,2	7,5% FKS	n.e. AS	5
PC12	DMEM	1,1	4	3,7	10% PS + 5% FKS		10

Abkürzungen: Glc = Glucose, Gln = Glutamin, n.e. AS = nicht essentielle Aminosäuren,
PS = Pferdeserum, FKS = fötales Kälberserum

B.3.3 In vivo-Isotopenmarkierung von Zellkulturen

1) Markierung mit (³⁵S)-Sulfat

Auf Plastikgewebekulturschalen gewachsene, in der Regel subkonfluente Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS oder, im Fall der PC12-Zellen mit sulfatfreiem DMEM gewaschen. Die Markierung erfolgte mit 0,25 mCi/ml (Langzeitmarkierung) oder 0,5-1,0 mCi/ml

(Pulsmarkierung) trägerfreiem (^{35}S)-Sulfat in einer minimalen Menge (z.B. 5 ml/75 cm²) sulfatfreiem Zellkulturmedium, bei dem 0,8 mM MgSO_4 durch 0,8 mM MgCl_2 ersetzt worden war. Die Konzentration an Serum (dialysiert gegen PBS oder 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) betrug 1/10 der Menge im Kulturmedium für die Stammhaltung (s. Tabelle B.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS bzw. DMEM gewaschen. Für Puls-Chase-Experimente wurden die Zellen anschließend mit Zellkulturmedium, das 10 mM Na_2SO_4 und 1/10 der normalen Serumkonzentration enthielt, inkubiert. Am Ende der Chase-Periode wurde das Medium gesammelt und die Zellen wie zuvor gewaschen. Die Zellen wurden im jeweils angegebenen Puffer durch Abspülen mit einer Pipette (AT20- und PC12-Zellen) oder mit einem Gummispatel abgelöst. Für die Analyse sezernierter Proteine wurden die Medien zentrifugiert (10 min, 100 x g, 4°C und im Fall von Langzeitmarkierungsmedien zusätzlich 60 min, 100000 x g, 4°C). (Lee und Huttner, 1983).

2) Markierung mit (^{32}P)-Phosphat

Die Phosphatmarkierung wurde entsprechend der Sulfatmarkierung durchgeführt mit folgenden Änderungen: Die Zellen wurden vor der Markierung mit phosphatfreiem Medium (1 mM NaH_2PO_4 ersetzt durch 1 mM NaCl) gewaschen und 18-20 Stunden mit 1 mCi/ml (^{32}P)-Phosphat in phosphatfreiem Medium mit 1,5% Pferdeserum (dialysiert gegen HEPES/NaCl-Puffer, vgl. B.3.3.1), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin-sulfat markiert.

3) Markierung mit Aminosäuren

Die Markierung mit Aminosäuren wurde entsprechend der Sulfatmarkierung durchgeführt mit folgenden Änderungen: Das Markierungsmedium war entweder Methionin- oder Tyrosin-frei und enthielt 25 $\mu\text{Ci/ml}$ (^{35}S)-Methionin oder 50-300 $\mu\text{Ci/ml}$ (^3H)-Tyrosin.

B.3.4 Depolarisationsstimulierte Sekretion aus PC12-Zellen

Tabelle B.2: Puffermedien für die Depolarisation

	Puffer			
	K5	K55	K5, Ca ²⁺ -frei	K55, Ca ²⁺ -frei
NaCl (§)	127	77	130	80
KCl	5	55	5	55
CaCl ₂	2,2	2,2	-	-
Na ₂ HPO ₄	0,33	0,33	0,33	0,33
KH ₂ PO ₄	0,44	0,44	0,44	0,44
NaHCO ₃	4,2	4,2	4,2	4,2
Glucose	5,6	5,6	5,6	5,6
HEPES	10	10	10	10

(§): alle Konzentrationsangaben in mM

pH-Wert = 7,2

B.3.4.1 Noradrenalinsekretion

Konfluente PC12-Zellen auf polyornithinbeschichteten Kulturschalen (1,75 cm²) wurden zweimal mit sulfatfreiem Markierungsmedium (s. Abschnitt B.3.3.1) gewaschen und 5-18 Stunden mit sulfatfreiem Markierungsmedium präinkubiert, um der Stimulation sulfatmarkierter Zellen vergleichbare Bedingungen zu schaffen (s.u., B.3.4.2). Anschließend wurden die Zellen 1 Stunde mit (³H)-Noradrenalin beladen (0,25 µCi/ml in sulfatfreiem Markierungsmedium) und danach zweimal mit 0,5 ml eiskaltem K5-Puffer mit oder ohne Calcium gewaschen. Zur Depolarisation wurden die Zellen mit je 0,5 ml Medium (K5- oder K55-Puffer, mit oder ohne Calcium) 0-15 min bei 37°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die Medien von zwei Parallelansätzen wurden vereinigt und Zellen sowie Zelltrümmer über ein Saccharosekissen (3 ml, 0,3 M) abzentrifugiert (60 min, 150000 x g, 40°C im Schwingrotor). Die Zellen wurden in 0,5 ml SDS-Puffer abgelöst und die Tritiumradioaktivität in Zellen und zentrifugierten Medien durch Scintillationszählung bestimmt. (Greene und Rein, 1977; die Methode wurde entsprechend einer laborinternen Vorschrift von Dr. Heumann, Martinsried modifiziert.)

B.3.4.2 Sekretion der Sekretogranine

Konfluente Zellen wurden 20 h mit (³⁵S)-Sulfat markiert (s. B.3.3.1). Die Depolarisation wurde wie in B.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Medien wurden 5 min bei 100 x g (RT) und 30 min bei 100000 x g (40°C) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,5 ml Puffer C abgelöst, schockgefroren, aufgetaut, 10 sec mit Ultraschall behandelt und das Homogenat zentrifugiert (30 min, 43000 x g, 40°C). Aliquots der Überstände (= Tritonextrakt) (10 µl, 0,2 mg/ml Protein) und der zentrifugierten Medien (200 µl) wurden zur Isolation der Sekretogranine mit 15 µl Antiserum 3 inkubiert und die Immunkomplexe mit Staphylococcus aureus isoliert (s. B.7.5.2).

B.3.5 Proteinase-Behandlung ganzer Zellen

Die Zellen (auf 1,75 cm²-Kulturschalen) wurden 2x mit PBS gewaschen und mit 0,2 ml Proteinase K bzw. Pronase (0,1-1 mg/ml) in Ca-Mg-PBS auf einem Kippschüttler bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 ml Rinderserumalbumin, Hämoglobin (Endkonzentration je 0,25 mg/ml) und PMSF (Endkonzentration 1 mM) in PBS gestoppt. Die Zellen, die sich während der Inkubation vom Substrat abgelöst hatten, wurden sedimentiert, mit PBS gewaschen und nach Resuspendieren in PBS die Proteine mit TCA gefällt (10% Endkonzentration, 15 min, 40°C). Das TCA-Präzipitat wurde mit NaOH neutralisiert und sofort in SDS-Probenpuffer auf 100°C erhitzt. Als positive Kontrolle (Nachweis der Proteasesensitivität der Proteine) wurden Zellen in Puffer A hypoton lysiert (vgl. B.6.1). Aliquots des Lysats wurden mit dem 4-fachen Volumen Proteinase in Ca-Mg-PBS unter gleichen Bedingungen wie die intakten Zellen inkubiert, die

Membranen durch Ultrazentrifugation (30 min, 100000 x g) sedimentiert und die Proteine mit TCA präzipitiert.

B.4 In vivo-Markierung von Ratten mit (^{35}S)-Sulfat

B.4.1 Markierung und Präparation der Gewebe

Adulten männlichen und weiblichen keimfreien Ratten (je ca. 100 g) wurden unter sterilen Bedingungen je 17 mCi trägerfreies (^{35}S)-Sulfat in PBS mit 0,8 mM Methionin und 1,8 mM Cystein injiziert. Nach 4 bzw. 12 Stunden wurde die gleiche Dosis (^{35}S)-Sulfat erneut injiziert und nach 15 h die Tiere mit Äther narkotisiert. Die Tiere wurden durch die linke Herzkammer 1 min lang mit 150 mM NaCl, 5 g/l Procain/HCl und 64000 U/l Heparin perfundiert (Flußrate 25 ml/h) wie im Detail von Glauert (1974) beschrieben. Unmittelbar nach dem Start der Perfusion wurde die rechte Vorkammer geöffnet und das durch das Perfusionsmedium ca. 1/10 verdünnte Blut gesammelt. Die perfundierten Gewebe wurden seziert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 200 x g) vom Blutplasma getrennt und mit PBS gewaschen. Durch Zentrifugation der Blutzellen (10 min, 3000 x g) wurden die Leukozyten, die als weiße Schicht auf dem Sediment der Erythrozyten lagen, abgetrennt. Die Leukozyten wurden mit einer Pasteurpipette gesammelt, wobei ein Teil der Erythrozyten mit abgehoben wurde. Durch wiederholte Zentrifugation wurden die Leukozyten weiter angereichert (Riggs, 1981; Hille et al., 1984).

B.4.2 Homogenisation der Gewebe

Die Gewebe wurden aufgetaut, in Stücke geschnitten und in eiskaltem Puffer A (10 ml/g Gewebe) durch Pottern (3 x 1000 upm) und Ultraschallbehandlung (2 x 15 sec, Branson Sonifier, maximale Energie) homogenisiert. Die Blutzellen wurden mit 5 Volumen Puffer A lysiert. Membranen und Bindegewebe wurden durch Ultrazentrifugation abgetrennt (30 min, 130000 x g, 4°C). Ein Teil des löslichen Überstands (= Gewebsextrakt) wurde mit 2 M NaCl auf 100 mM NaCl eingestellt und die Hitzebehandlung wie in B.6.2 beschrieben durchgeführt.

B.4.3 In vitro-Markierung von Blutplasma der Ratte

Einer adulten weiblichen Wistar-Ratte wurde unter Äthernarkose Blut durch Herzpunktion entnommen. 3 ml Blut wurden mit 4 mg Natriumheparinat in 0,5 ml DPBS vermischt. Ein Aliquot wurde durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, anschließend 30 min, 33000 x g, 4°C) von Blutzellen befreit. Je 1 ml Blut bzw. Blutplasma wurden mit trägerfreiem (^{35}S)-Sulfat (0,25 mCi/ml) und Antibiotika (0,133 mg/ml Streptomycin, 0,637 mg/ml Penicillin, 5 µg/ml Chloramphenicol, 10 µg/ml Tetracyclin) inkubiert. Alle Zusätze wurden in Form einer 100-fach konzentrierten Stammlösung

in DPBS (Tetracyclin: 5% Methanol, 95% DPBS) zugegeben. Die Inkubation erfolgte 15 h bei 37°C und 6,5% CO₂. Anschließend wurden die Blutzellen durch Zentrifugation (s.o.) entfernt und die Plasmaproteine durch SDS-PAGE aufgetrennt.

B.5 Proteinanalytische Methoden

B.5.1 Acetonpräzipitation

Die Proteinlösungen wurden mit dem 5-fachen Volumen an Aceton versetzt und 3-15 h bei -20°C inkubiert. Das Präzipitat wurde mit auf -20°C gekühltem 80% (V/V) Aceton gewaschen.

B.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

B.5.2.1 SDS-PAGE

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Gele waren 1 mm dick, die Länge des Sammelgels betrug 2-3 cm, die des Trenngels 10-15 cm. Als Molekulargewichtsstandards wurden Myosin (205 kD), β -Galaktosidase (116 kD), Phosphorylase b (97 kD), Rinderserumalbumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (30 kD), Trypsininhibitor (20,1 kD) und α -Lactalbumin (14,4 kD) verwendet. Den Auflösungsbereich der Trenngele in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration zeigt Tabelle B.3.

Tabelle B.3: Auflösungsbereich der SDS-PAGE nach Laemmli.

Polyacrylamidkonzentration (%)	untere Grenze des Auflösungsbereichs
15	ca. 10 kD
11	ca. 20 kD
10	ca. 25 kD
7,5	ca. 35 kD

B.5.2.2 Zweidimensionale PAGE

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde nach der Methode von O'Farrell durchgeführt. Die erste Dimension war entweder eine isoelektrische Fokussierung (IEF) (O'Farrell, 1975) oder ein pH-Gradient ohne Gleichgewichtseinstellung ("NEPHGE") (O'Farrell et al., 1977). Die zweite Dimension war eine SDS-PAGE nach Laemmli (s. B.5.2.1). Tabelle B.4 zeigt die für die Herstellung verschiedener pH-Gradienten verwendeten Ampholytkonzentrationen. Die proteinhaltigen Proben wurden vor der Elektrophorese durch Acetonpräzipitation konzentriert und dadurch gleichzeitig von Salzen bzw. SDS befreit. Die pH-Gradienten wurden nach Elution der Ampholyte aus 0,5 cm langen Abschnitten des Rundgels in 1 ml

H₂O gemessen.

Tabelle B.4: Ampholytgemische für die Herstellung von pH-Gradienten bei der IEF bzw. NEPHGE.

	Ampholyte				pH-Gradient
	pH 3,5-5	pH 5-7	pH 7-9	pH 3,5-10	
			(%)		
IEF	1,0	1,0	-	0,8	pH 4-6,5
	0,6	0,6	0,8	0,8	pH 3,5-7
NEPHGE	-	-	-	2,8	pH 4-9

B.5.2.3 Proteinfärbung nach Polyacrylamidgelelektrophorese

1) Coomassie Blau-Färbung in Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden entweder 60 min mit 0,1% (W/V) Coomassie Blau R in Methanol:Eisessig:H₂O (5:1:4) oder über Nacht in 0,05% Coomassie Blau R in Isopropanol:Eisessig:H₂O (2,5:1:6,5) gefärbt und mit Isopropanol:Eisessig:H₂O (1:1:8) entfärbt. (Vgl. Lee und Huttner, 1983).

2) Silberfärbung in Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Oakley et al., (1980) durchgeführt. Die Proteine wurden im Gel mit 5% Formaldehyd, 25% Äthanol fixiert (30 min). Die Gele wurden gewässert, mit ammoniakalischer Silbernitratlösung imprägniert und die Silberfärbung mit Zitronensäure/Formaldehydlösung entwickelt wie von Oakley et al. beschrieben. Anschließend wurden die Gele zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfärbung ca. 1 min in 1/7 verdünnter Fotofixierlösung (Kodak Superfix) inkubiert und anschließend gewässert (3x 20 min).

3) Nicht fixierende Färbung in Polyacrylamidgelen mit Kaliumchlorid

Die Gele wurden mit eiskaltem Wasser gespült und 1- bis 5 min in eiskalter 0,25 M KCl-Lösung mit 1 mM Dithioerythrit inkubiert, bis sich die Proteine als milchigweiße Banden zeigten (Hager und Burgess, 1980). Die Proteinbanden wurden unmittelbar danach aus dem Gel ausgeschnitten.

4) Proteinfärbung auf Nitrocellulosefiltern

- Amidoschwarz-Färbung: Die Proteine wurden 2 min mit 0,1% (W/V) Amidoschwarz in Methanol:Eisessig:H₂O (40:10:50) gefärbt und mit 10% (V/V) Methanol in H₂O entfärbt. (Towbin et al., 1979).

- Ponceau S-Färbung: Die Proteine wurden 2 min mit 2 g/l

Ponceau S in 3% Trichloressigsäure gefärbt und mit H₂O entfärbt.

B.5.3 Limitierte Proteolyse

B.5.3.1 Limitierte Proteolyse nach Cleveland

Die von Cleveland et al. (1977) publizierte Methode wurde wie von Lee und Huttner (1983) beschrieben modifiziert: Durch zweidimensionale SDS-PAGE zur Homogenität gereinigte, mit Coomassie Blau gefärbte Proteinbanden (ca. 1 µg Protein) wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, in SDS-Probenpuffer aufgeschwollen und 30 min mit 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS äquilibriert. Die Gelstücke wurden in den Probenpuffer einer SDS-PAGE plaziert und mit V8-Protease (0,75 µg in 75 µl 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 15% Glycerin, 0,2 mg/ml Pyronin Y) überschichtet. Die Elektrophorese wurde 15 h bei 50 V und 2 h bei 200 V durchgeführt.

B.5.3.2 Tryptische Peptidmuster

Die Methode wurde wie von Elder et al. (1977) beschrieben durchgeführt. Das Prinzip der bei der Radiojodierung der Proteine ablaufenden chemischen Reaktionen ist in Abb. B.1 zusammengefaßt.

Durch zweidimensionale SDS-PAGE gereinigte, mit Coomassie Blau gefärbte Proteinbanden (ca. 1 µg Protein) wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit 10% Methanol gewaschen, um SDS, Coomassie Blau und Salze zu entfernen, und anschließend durch Lyophilisation getrocknet. Die Gelstücke wurden mit 20 µl Natriumphosphatpuffer (0,5 M, pH 7,5), 0,1 mCi Na¹²⁵J in 10 µl Natriumphosphatpuffer und 10 µl frisch angesetztem Chloramin T (1 mg/ml in H₂O) geschwollen und 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Natriumbisulfit (1mg/ml) gestoppt. Nach 30 min wurden die Gelstücke mit 10% Methanol in H₂O gewaschen (60 h mit 5 Wechseln) und anschließend lyophilisiert. Die jodierten Proteine wurden durch 25 µg TPCK-Trypsin in 0,5 ml NH₄HCO₃ (50 mM, pH 8) aus dem Gel eluiert (2x12 h, 37°), die Peptide wurden durch Lyophilisation konzentriert und auf Zellulose-Dünnschichtplatten analysiert. Die erste Dimension war eine Elektrophorese bei pH 1,55 (s. B.9.3), die zweite eine aufsteigende Chromatographie (Laufmittelgemisch: Butanol:Pyridin:Eisessig:H₂O, 32,5:25:5:20). Die radiojodierten Peptide wurden durch Fluorographie nachgewiesen.

Abb. B.1: Radiojodierung von Proteinen.

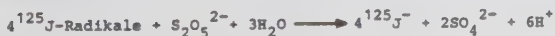
1) Aktivierung:



2) Jodierung:



3) Reduktion:



B.6 Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen

B.6.1 Hypotone Lyse der PC12-Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden durch Zugabe von eiskaltem Puffer A (10 ml/1 g Zellen) aufgetaut, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter Leitungswasser aufgetaut. Das Homogenat wurde in einem Polystyrolgefäß im Wasserbad 3 x 15 sec mit Ultraschall behandelt ("Branson Sonifier", maximale Energie) und dazwischen jeweils auf Eis gekühlt. Die Membranen und nicht aufgebrochene Zellen wurden durch Ultrazentrifugation abgetrennt (30 min, 100000 x g, 4°C). Der resultierende Überstand (=Ü1) wurde für den Hitzeschritt verwendet, der Niederschlag (N1) wurde in SDS-Probenpuffer aufgelöst.

B.6.2 Hitzeschritt

Der lösliche, hypotone Überstand der Ultrazentrifugation (Ü1) (vgl. B.6.1) wurde soweit im Ergebnisteil vermerkt mit 2 M NaCl auf die angegebene NaCl-Konzentration eingestellt. Die Proben wurden in einem Glasgefäß mit großer wärmeaustauschender Oberfläche in einem auf 100°C erhitzten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben schnell auf Eis abgekühlt. Nach Ultrazentrifugation der resultierenden Proteinsuspension (30 min, 100000 x g, 4°C) wurde der hitzestabile Überstand (Ü2) abgenommen und das Präzipitat (N2) in SDS-Probenpuffer gelöst. (Der Hitzeschritt wurde analog auch für lösliche Überstände aus Hautfibroblasten bzw. Rattengewebe, die jeweils 100 mM NaCl enthielten, angewendet.)

B.6.3 Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel

1) Vorbehandlung des Ionenaustauschers

DEAE-Sephacel wurde nach Vorschrift des Herstellers durch sukzessives Waschen mit 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl und 2 M NaCl präzyklisiert.

2) Vorversuche im Reagenzgefäß

Hitzestabiler Überstand (Ü2) von sulfatmarkierten PC12-Zellen wurde mit 0,5 M MES-NaOH, pH 6,0 auf pH 6 eingestellt. Aliquots von DEAE-Sephacel wurden mit 0-0,5 M NaCl in Puffer B äquilibriert. In Eppendorfgefäßen wurden 100 µl DEAE-Sephacel, 15 µl Ü2 und 85 µl Puffer B der entsprechenden Ionenstärke inkubiert (30 min, 4°C). Nach Sedimentation des Ionenaustauschers (1 min, 10000 x g) wurde der Überstand (= nicht gebundene Proteine) abgenommen. der Ionenaustauscher wurde 3x mit 0,2 ml Puffer B der entsprechenden Ionenstärke gewaschen und die gebundenen Proteine durch Kochen mit 3x 200 µl SDS-Probenpuffer eluiert.

3) Präparative Säulenchromatographie

5 ml DEAE-Sephadex wurde in einer Säule von 9x80 mm mit 0,1 M NaCl in Puffer B äquilibriert. Der mit 1 N HCl auf pH 6,0 eingestellte hitzestabile Überstand (Ü2) wurde mit einer Flußrate von 6 ml/h aufgetragen (maximal 50 mg Protein/5 ml Ionenaustauscher) und anschließend mit 0,2 M NaCl in Puffer B gewaschen, bis die Extinktion (280 nm) des Durchflusses auf den Ausgangswert abgefallen war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,2- bis 0,4 M NaCl in Puffer B. Anschließend wurde mit 2 M NaCl nacheluiert. Die Ionenstärke der Fraktionen wurde durch Leitfähigkeitsmessung und Vergleich mit der Leitfähigkeit von Stammlösungen bestimmt.

B.7 Immunologische Methoden

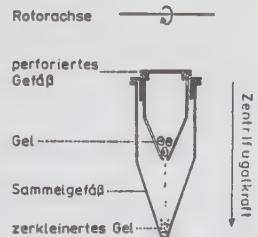
B.7.1 Gewinnung von Antisera

Präparation der Antigene für die Immunisierung

Durch zweidimensionale SDS-PAGE zur Homogenität gereinigte Proteine wurden entsprechend der Proteinfärbung mit einem sterilen Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die feuchten Gelstücke wurden mit dem Skalpell grob zerkleinert und durch Zentrifugation durch eine Pore (0,5 mm) homogenisiert (s. Abb. B.2). Die Gelsuspension wurde entweder direkt für die Immunisierung verwendet oder mit einem entsprechenden Volumen Freundschem Adjuvans emulsifiziert. Für die Erstimmunisierung wurde komplettes-, für die folgenden Injektionen inkomplettes Freundsches Adjuvans verwendet.

Abb. B.2: Homogenisation von Acrylamidgelen durch Zentrifugation.

Ein 1 ml-Eppendorfgefäß wurde an der Spitze mit einer Nadel perforiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, dessen Deckel ausgestanzt war. In das perforierte Gefäß wurden 100-200 µl Gel und ein gleiches Volumen PBS gefüllt. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g) bei horizontaler Position der Eppendorfgefäße befanden sich das fein zerkleinerte Gel und der PBS-Puffer im unteren Gefäß.



Antigeninjektion und Blutabnahme

Die polyklonalen Antisera wurden von Kaninchen gewonnen. 7-10 Tage vor der ersten Antigeninjektion wurde aus der Ohrvene Blut für das Präimmunserum entnommen.

Die Injektion des Antigens erfolgte im Fall der Sekretogranine intradermal in den Rücken. Nach ca. 10 Tagen wurden 20-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. 10 Tage nach der 4. Boosterinjektion wurden die Kaninchen vom Tierarzt narkotisiert und durch Herzpunktion ausgeblutet. Im Fall von p45 wurden jeweils ca. 15 μ g Protein in die Lymphknoten (Tag 1), intradermal in die Achselhöhle und am Hals (Tag 21) und zweimal intramuskulär ins Bein (Tag 46 und 60) injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 10 Tage nach der letzten Injektion und danach zweimal in wöchentlichen Abständen (Louvard et al., 1982).

Präparation der Antiseren

Im Anschluß an die Blutgerinnung (1 h bei RT, danach über Nacht bei 4°C) wurden die Blutzellen abzentrifugiert (30 min, 10000 x g, 4°C). Der Überstand (Serum) wurde schockgefroren und bei -20°C gelagert.

B.7.2 Affinitätsreinigung von anti-p45-Immunglobulin

Kopplung von p45 an Sepharose 4B

P45 wurde aus HepG2-Zellen, die mit (³⁵S)-Sulfat schwach markiert waren, entsprechend dem Arbeitsschema zur Sekretograninreinigung angereichert (s. Abb. C.16 und Methoden B.6). Die von der DEAE-Säule eluierten Fraktionen (ca. 1 mg Protein in 1,4 ml, davon ca. 10% p45) wurden entsprechend der Vorschrift des Herstellers an 1 g mit Cyanbromid aktivierte Sepharose 4B gekoppelt (2 h Bindung bei RT in Kopplungspuffer; 0,1 M Natriumcarbonat, 0,5 M NaCl, pH 8,3; Waschen mit Kopplungspuffer; Inaktivierung des Cyanbromids 2 h bei RT in 0,5 M Tris-HCl, pH 8; Waschen jeweils zweimal abwechselnd mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4 und Kopplungspuffer). Die Effizienz des Waschvorgangs wurde über die Abnahme der eluierten Radioaktivität kontrolliert. Es wurden etwa 75% des eingesetzten Proteins an die Sepharose gebunden. Die Lagerung der mit p45 beladenen Sepharose (p45-Sepharose) erfolgte in PBS mit 0,02% NaN₃ bei 4°C.

Affinitätsreinigung des Immunglobulins

5 ml anti-p45-Antiserum wurden über Nacht bei RT unter ständigem leichtem Mischen mit der p45-Sepharose inkubiert. Die Suspension wurde in eine Säule gefüllt und die p45-Sepharose mit PBS gewaschen, bis die Extinktion (280 nm) des Durchflusses auf den Ausgangswert (Extinktion von PBS) zurückgegangen war. Die gebundenen Immunglobuline wurden mit 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 eluiert (Durchfluß mit Schwerkraft) und Fraktionen von 1 ml in Gefäße mit 0,3 ml 1 M KH₂PO₄ gesammelt (Wilchek et al., 1984). Die Fraktionen, die UV-absorbierendes Material enthielten, wurden durch Vakuumdialyse gegen PBS eingengt (Schleicher und Schüll Ultrahülsen, UH100/25). Die konzentrierte Probe (ca. 50 μ g/ml Immunglobulin wurde auf 0,2% Rinderserumalbumin und 0,02% NaN₃ eingestellt und bei 4°C gelagert.

B.7.3 Immunoblot-Analyse

Lösungen:

Transferpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 20% Methanol, 0,1% SDS, pH 8

Blockierpuffer: 3% Rinderserumalbumin, 7% Hämoglobin und 0,2% NaN_3 in PBS

NP40-Puffer: 0,1% NP40 in Blockierpuffer

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. B.5.2) und die Antikörperbindung wie folgt analysiert:

1. Transfer

Die Proteine wurden nach der Methode von Towbin et al. (1979) aus den Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose transferiert (4 h, 0,3 A, Ausgangsspannung 30 V, Spannungsanstieg bis auf 40 V). Bis zu einem Molekulargewicht von ca. 150 kD wurden die Proteine quantitativ transferiert. Lediglich am oberen Rand des Gels waren noch hochmolekulare Proteine durch Coomassie Blau-Färbung nachweisbar.

2. Fixierung der Proteine

Da die hydrophilen Sekretogranine in den folgenden Inkubationen partiell vom Nitrozellulosefilter abgewaschen wurden (s. Abb. B.3a), wurden die Proteine nach dem Transfer 1 h lang mit 0,025% Glutaraldehyd in PBS auf dem Filter fixiert. Überschüssiger Glutaraldehyd wurde mit 0,1 M Glycin/Tris pH 7,5 reduziert (2x 30 min).

3. Bindung und Nachweis der Antikörper

Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch Inkubation des Filters mit Blockierpuffer abgesättigt (2-3 h Inkubation). Die Filter wurden 1-15 h mit verdünnten Antisera (1:100 bis 1:200 in NP40-Puffer) inkubiert und nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt (6x 20 min mit 0,1% NP40 in PBS). Die Filter wurden 0,5-2 h mit (^{125}J)-Protein A (0,25 $\mu\text{Ci/ml}$ in NP40-Puffer) inkubiert, mit 0,1% NP40 in PBS gewaschen (6x 20 min) und an der Luft getrocknet. (^{125}J)-Protein A wurde durch Fluorographie nachgewiesen.

Durch Variation der Inkubationszeiten mit Antiserum bzw. Protein A wurden Bedingungen ermittelt, bei denen das Verhältnis von spezifischem Signal zum unspezifischen Hintergrund optimal war (Abb. B.3b).

Für den Nachweis der Antikörper durch die Peroxidasemethode wurden die Bedingungen wie folgt geändert: Der Blockierpuffer enthielt 8% Rinderserumalbumin und kein NaN_3 . Zum Nachweis der

gebundenen Immunglobuline wurde mit Peroxidase gekoppeltes, gegen Kaninchen-IgG gerichtetes Ziegen-IgG (Jackson 111-3545) verwendet. Nach Waschen mit 0,3% Tween20 in PBS und 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 wurde die Peroxidasereaktion mit Diaminobenzidin und H_2O_2 als Substrat durchgeführt. Einzelheiten der Methode s. Tsang et al. (1983).

Abb. B.3: Optimierung der Immunoblot-Technik.

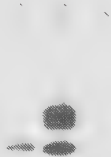
a) Einfluß der Proteinfixierung.

PC12-Zellhomogenat (50 μ g Protein) wurde durch SDS-PAGE (7,5% Acrylamid im Trenngel) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Von zwei äquivalenten Filterstreifen wurde einer (Spur 2) mit Glutaraldehyd behandelt, um die Proteine zu fixieren. Spur 1 enthielt die gleiche Menge nicht fixierter Proteine. Anschließend wurden beide Filter mit Antiserum 3 und Protein A inkubiert (s. B.7.3). Spur 3: Präimmunkontrolle eines mit Glutaraldehyd fixierten Filterstreifens.

b) Einfluß der Inkubationszeiten.

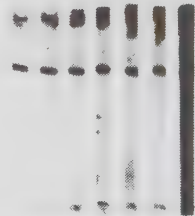
PC12-Homogenat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fixiert. Äquivalente Filterstreifen wurden 0,5-17 h mit Antiserum 2 und 0,5-2 h mit 125 I-Protein A inkubiert (s. B.7.2). Man beachte die drastische Erhöhung unspezifischer Bindung nach 17 h Inkubation mit Antiserum.

a



Antiserum : +
Fixation : +

b



Inkubationszeit
mit Antiserum (h): 0,5 1 2 4 4 4 17
mit Protein A (h): 2 2 2 2 1 0,5 2

B.7.4 Dot-Blot

Die quantitative Analyse von Antiseren wurde durchgeführt wie im Detail von Jahn et al. (1984) beschrieben.

1 μ g Protein einer angereicherten Sekretograninpräparation (hitze stabiler Überstand aus PC12-Zellen, s. B.6.2) wurde punktförmig auf Nitrocellulosefilter aufgetragen. Die Proteine

wurden mit Eisessig:Isopropanol:H₂O (1:2,5:6,5) fixiert, die Filter mit PBS äquilibriert und mit 5% BSA in PBS blockiert. Nach Inkubation (60 min, RT) mit 200 µl verdünntem Antiserum (Verdünnung 1:10-1:100 in TTN(*), 5% BSA) wurden die Filter mit TTN gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden durch (¹²⁵J)-Protein A (0,5 µCi/ml in TTN) nachgewiesen. Nach Waschen mit TTN wurden die Filter getrocknet und die (¹²⁵J)-Radioaktivität durch Scintillationszählung quantifiziert. (*): TTN = 0,1% TritonX-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl.

B.7.5 Immunpräzipitation mit Staphylococcus aureus

Die Methode wurde nach Ivarie und Jones (1979) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt.

B.7.5.1 Vorbehandlung der Staphylococcen

Die fixierten Staphylococcen (Pansorbin^R) wurden 2x mit 8% Hämoglobin in Puffer C gewaschen und anschließend im gleichen Puffer resuspendiert (10%, w/v).

B.7.5.2 Allgemeines Verfahren der Immunpräzipitation

Die das Antigen enthaltende Lösung und Antiserum (z.T. mit Präimmunserum verdünnt) wurden mit Puffer C verdünnt wie im Ergebnisteil angegeben und 3 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von Staphylococcus aureus-Suspension (50 µl Suspension/10 µl Antiserum) wurde 15-45 min unter ständigem Mischen bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Testansatz mit 1 ml Puffer C, 8% Hämoglobin verdünnt, die Staphylococcen wurden abzentrifugiert (10 sec, 10000 x g) und 3x mit 1,2 ml Puffer C gewaschen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Kochen mit 125 µl SDS-Probenpuffer eluiert.

B.7.5.3 Herstellung des Zellextrakts (Tritonextrakts) aus methioninmarkierten PC12-Zellen

Ca. 2x10⁷ Zellen (400 µg Protein) wurden in 2 ml Puffer C suspendiert, gefroren und 3x15 sec mit Ultraschall behandelt (s. Abschnitt B.6.1) und das Homogenat zentrifugiert (100000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand (Triton-Extrakt) wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt.

B.7.5.4 Immunpräzipitation der Sekretogranine aus Rattengewebe

Die gefrorenen Gewebe wurden mit einem Mörser auf Trockeneis zerstoßen, durch Pottern in 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF, pH 7,5 (10 ml/g Gewebe) homogenisiert und 5 min auf 100°C erhitzt. Nach Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C) wurden Aliquots des Überstands (2-4 mg Protein) 1:10 mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% (W/V) NP40, 0,5% (W/V) Desoxycholat und 5 mM EDTA verdünnt und mit einer Mischung von je 25 µl Antiserum 1 und

2 inkubiert (5 h). Die Immunkomplexe wurden an Staphylococcus aureus adsorbiert (s. B.7.5.2) und die Sekretogranine durch Kochen in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3% (V/V) β -MSH und 10 mM EDTA selektiv eluiert. Unter diesen Bedingungen befanden sich die hitzestabilen Sekretogranine, jedoch keine Immunglobuline im Überstand der anschließenden Zentrifugation (10 min, 10000 x g). Die eluierten Proteine wurden durch Acetonpräzipitation konzentriert (Rosa et al., 1985b).

B.7.6 Indirekte Immunfluoreszenz in Gewebekulturzellen

Fibroblasten wurden auf sterilen Deckgläschen für die Mikroskopie subkonfluent ausgesät, ca. 24 h kultiviert und anschließend zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 3% Formaledehyd in 0,12 M Phosphatpuffer, pH 7,5 (vorgewärmt auf 37°C), 40 min bei RT. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 2x15 min mit 0,1 M Glycin-Tris, pH 7,2 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert (2x15 min mit Tritonpuffer: 0,3% Triton X-100, 20 mM Natriumphosphat, 450 mM NaCl, pH 7,2-7,4) und dreimal mit 0,2% Gelatine in Tritonpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Antikörperverschüttung (1:50 bis 1:100 in Tritonpuffer mit 0,2% Gelatine) über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente durch Ammoniumsulfatpräzipitation angereichertes Kaninchen-Normal-IgG, das auf vergleichbare Proteinkonzentration verdünnt wurde. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit Tritonpuffer, 0,2% Gelatine (3x5 min) entfernt. Anschließend wurde 1 h mit Schaf-anti-KaninchenIgG-Antiserum inkubiert (gekoppelt mit Rhodamin, Biosys-60200, 1:200 in Tritonpuffer, 0,2% Gelatine verdünnt). Nach Waschen (2x5 min mit Tritonpuffer; 0,2% Gelatine; 2x5 min mit Tritonpuffer; 3x5 min mit PBS; 3x5 sec mit dest. Wasser) wurden die Deckgläschen mit Mowiol (Hoechst) eingebettet. Die Anregung der Immunfluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenz-Auflicht-Kondensor (Zeiss, III RS) bei 546 nm. Die photographischen Aufnahmen (Film: TRI-X PAN, Kodak) wurden für 32000 ASA automatisch belichtet und die Negative für 16000 ASA entwickelt.

B.8 Zellfraktionierung

B.8.1 Anreicherung integraler Membranproteine durch Detergenzkondensation

Eine Übersicht über den Arbeitsgang gibt Abb. C.40. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden auf der Kulturschale mit PBS gewaschen, nach Zugabe von Puffer A mit einem Gummispatel abgelöst und durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Tauen lysiert. Die Proteinkonzentration des Homogenats wurde auf 0,5-1 mg/ml (nach Lowry) eingestellt und anschließend 3x15 sec beschallt (s. B.6.1). Die Membranen wurden durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 30 min) von den hypoton löslichen Proteinen (Ü1)

getrennt. Das Membransediment wurde mit einem Dounce-Homogenisator (eng passendes Pistill) in 0,5 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 5 mM β -MSH, 0,1 mM PMSF, pH 7,4 resuspendiert, 30 min gerührt und die extrahierten Proteine (Ü2) durch Ultrazentrifugation (s.o.) abgetrennt. Das zweite Membransediment wurde nach dem gleichen Verfahren mit 0,1 M Na_2CO_3 extrahiert, der Überstand (Ü3) abgenommen und das Sediment mit dest. Wasser gespült, um Reste des alkalischen Carbonatpuffers zu entfernen. Anschließend wurde das Sediment in 1 ml Puffer D mit dem Dounce-Homogenisator resuspendiert, die Proteinkonzentration auf 0,1-1 mg/ml eingestellt und Triton X-114 (10% in Puffer D, präkondensiert nach Bordier, 1981) bis zu einer Endkonzentration von 1% (W/V) zugefügt. Nach Ultraschallbehandlung (10 sec) und Rühren (30-60 min) lag eine opake, fast homogene Suspension vor. Tritonunlösliches Material wurde durch Ultrazentrifugation (s.o.) sedimentiert. Aliquots (1 ml) des Tritonextrakts (Ü4) wurden auf ein Saccharosekissen (0,3 ml, 0,6% Saccharose, 0,06% Triton X-114 in Puffer D) in einem Eppendorffgefäß geladen und 3 min bei 30°C inkubiert. Durch Zentrifugation (10 min, 300 x g, RT) wurden die Tritonmicellen sedimentiert. Die obere, wässrige Phase (W) und die Interphase (I) (=Saccharosekissen) wurden gesammelt, die Detergenzphase und die Gefäßwände mit 0,5 ml auf 30°C vorgewärmtem Puffer D gespült und diese Pufferlösung mit der Interphase vereinigt. Die Detergenzphase wurde mit eiskaltem Puffer D auf 1 ml verdünnt. Für die weiteren Analysen wurden die Proteine aller Fraktionen mit Aceton präzipitiert.

B.8.2 Isotonische Homogenisation von Zellkulturzellen

Die gesamte Aufarbeitung wurde auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden auf der Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen und 30 sec mit 1 mM EDTA-NaOH, pH 7,4, 0,25 M Saccharose inkubiert, mit einem Gummispatel in 3 mM Imidazol-HCl, pH 7,4, 0,25 M Saccharose (= isotonischer Imidazolpuffer) abgelöst und 5 min bei 100 x g sedimentiert. Die Homogenisation erfolgte in isotonischem Imidazolpuffer (2 ml für eine konfluente 75 cm²-Kulturschale) mit einem Dounce-Homogenisator (6 Stöße bei HepG2-Zellen, 20 Stöße bei Fibroblasten). Das Ergebnis der Homogenisation wurde nach Zugabe von Trypan-Blau zu einem Aliquot des Homogenats mikroskopisch kontrolliert.

Durch Zentrifugation (10 min, 1000 x g) wurden die Zellkerne (N) vom postnukleären Überstand (PNÜ) getrennt. (Gieselmann et al., 1983).

B.8.3 Lysosomenpräparation

Die gesamte Aufarbeitung wurde auf Eis durchgeführt. Die Fibroblasten wurden isoton homogenisiert und ein postnukleärer Überstand hergestellt (s. B.8.2). Ca. 2 ml PNÜ wurde in Polyallomerzentrifugenröhrchen (Beckmann, "Quick-seal"TM) auf 32 ml Percoll (Ausgangsdichte: 1,055 in 0,25 M Saccharose) geladen. Die Bildung des Gradienten erfolgte bei 35000 x g im Vertikalrotor (Beckman VTi50, 40 min, 4°C, langsame

Beschleunigung, normale Bremse). Die integrierte Zentrifugalbeschleunigung am Ende des Laufs (ωt^2) betrug ca. $1,1 \times 10^{10} \text{ rad}^2/\text{sec}$.

Vom unteren Ende des Gradienten beginnend wurden 2 ml-Fraktionen gesammelt, in denen die Dichte (durch Messung der optischen Brechung und Umrechnung nach der vom Hersteller angegebenen Eichkurve), die Aktivität von Leitenzymen und die enthaltene Radioaktivität bestimmt wurden. Die Fraktionen wurden wie folgt zusammengefaßt: Fraktionen 1-4 (dichte Fraktionen) = Lysosomen, 5-11 = Zwischenfraktionen, 12-15 = leichte Membranen, Fraktion 16, die lösliche Proteine enthielt, wurde verworfen. Um die Membranen von löslichen Proteinen zu trennen und das meiste Percoll zu entfernen, wurden die drei Proben zentrifugiert (3,5 h, $100000 \times g$, 4°C). Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen und die als weiße Schicht über dem Percollsediment flotierenden Membranen gesammelt. Für die Analyse durch SDS-PAGE wurden die Proben sofort mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 100°C erhitzt. Dabei präzipitierten Reste von Percoll, die durch Zentrifugation (15 min, $10000 \times g$) abgetrennt wurden. (Gieselmann et al., 1983)

B.8.4 Inkubation tyrosinsulfatierter Proteine mit lysosomalen Enzymen

Die nach B.8.3 isolierten Lysosomen wurden 1:5 mit dest. H_2O verdünnt und durch Frieren und Tauen lysiert. Sulfatmarkierte, durch Hitzeschritt und DEAE-Chromatographie angereicherte Sekretogranine aus PC12-Zellen (1,25 ng in 0,25 ml Puffer B mit $0,4 \text{ M NaCl}$) wurden mit lysierten Lysosomen (6 mU β -N-Acetylglucosaminidase-Aktivität in 0,25 ml) 3,5 h bei 40°C mit oder ohne Proteinaseinhibitoren ($10 \mu\text{M}$ Leupeptin, 10 mM Propylamin, $10 \mu\text{g/ml}$ Aprotinin und 1 mM PMSF) inkubiert. Die Aktivität der Arylsulfatase A wurde vor und nach der Inkubation bestimmt (s. B.8.7.3). Als Kontrolle wurden Sekretogranine ohne Lysosomen inkubiert.

B.8.5 Differentielle Zentrifugation von Fibroblasten

Fibroblasten wurden isoton homogenisiert und ein postnukleärer Überstand hergestellt (s. B.8.2). Die gesamten Membranen des PNÜ wurden durch Ultrazentrifugation (60 min, $100000 \times g$, 40°C) vom Cytosol (C) getrennt und anschließend in einem dem PNÜ entsprechenden Volumen hypotonem Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4) durch Frieren, Tauen und Ultraschallbehandlung ($3 \times 10 \text{ sec}$, 40°C im Wasserbad, Bandelin Sonorex RK102) lysiert. Die Membranen (M) und ihr löslicher Inhalt (I) wurden durch Ultrazentrifugation (s.o.) voneinander getrennt.

B.8.6 Proteinasebehandlung des PNÜ

Der PNÜ von sulfatmarkierten Zellkulturen wurde mit $100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K inkubiert. Zur Kontrolle wurde PNÜ ohne Proteinase K inkubiert, und in einigen Fällen wurde $0,4\%$ Saponin

zugesezt. Nach 60 min bei 4°C wurden Rinderseumalbumin (Stammlösung 10 mg/ml in 3 mM Imidazol-HCl, pH 7,4, 0,25 M Saccharose) und PMSF (Stammlösung 100 mM in Äthanol) bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml bzw 2 mM hinzugefügt. Nach Zentrifugation (60 min, 100000 x g) wurden die Überstände und die in PBS resuspendierten Membransedimente mit 10% TCA (Endkonzentration) versetzt. Nach 15 min bei 4°C wurde das Proteinpräzipitat abzentrifugiert (5 min, 10000 x g, 4°C) und sofort in SDS-Probenpuffer gekocht. (Vgl. Dobberstein et al., 1979).

B.8.7 Messung der Aktivität von Leitenzymen

1) β -N-Acetylglucosaminidase

Literatur: v. Figura, 1977.

Der Testansatz enthielt in 100 μ l:

- 5 mM p-Nitrophenyl- β -N-Acetylglucosaminid
- 50 mM Natriumcitratpuffer pH 4,6
- 0,02 % NaN_3
- 0,1 % Rinderseumalbumin
- 0,01 % Triton X-100

bis zu 50 μ l Enzymlösung, gegebenenfalls verdünnt mit PBS.

Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 0,4 M Glycin-NaOH, pH 10,4 gestoppt und die Extinktion bei 405 nm gegen einen Blindwert (PBS anstatt Enzymlösung) gemessen. Die Enzymaktivität wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol (18500 l/mol x cm) berechnet. 1 U/ml entsprach einem Umsatz von 1 μ mol/min.

2) Galaktosyltransferase

Literatur: Rome et al., 1979 und Bauer, 1976.

Der Testansatz enthielt in 50 μ l:

- 7 mg/ml Ovalbumin
- 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 20 mM MnCl_2
- 2 mM ATP
- 122 nM UDP-6-(^3H)-Galaktose
- 0,5 % Triton X-100
- 20 μ l Enzymlösung.

Als Blindwert diente ein Testansatz ohne den Akzeptor Ovalbumin. Nach 60 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml eiskalter, 10% TCA gestoppt. Nach 45 min bei 4°C wurde das Proteinpräzipitat abzentrifugiert (4 min, 10000 x g) und zweimal mit 0,5 ml 5% TCA gewaschen. Die Proteine wurden in 10% NaOH gelöst (15-60 min, 100°C), ein Aliquot mit Essigsäure neutralisiert und die inkorporierte Tritiumradioaktivität bestimmt.

3) Arylsulfatase A

Literatur: Porter et al., 1969.

Der Testansatz enthielt in 500 μ l:

5 mM p-Nitrocatecholsulfat
 0,5 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5
 0,1 % NP-40

100 μ l Enzymlösung, verdünnt mit Acetatpuffer.

Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 1 N NaOH gestoppt, der Testansatz zentrifugiert (5 min, 10000 x g) und die Extinktion bei 515 nm gegen den Blindwert (zum Zeitpunkt 0 gestoppter Testansatz) bestimmt.

Die Enzymaktivität wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrocatechol (12600 l/mol x cm) berechnet.

B.9 Chemische Analysen

B.9.1 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach Lowry (1956) wurden die proteinhaltigen Lösungen zunächst einer TCA-Präzipitation unterworfen. 5-100 μ g Protein wurden in 1 ml 10% TCA-Lösung inkubiert (15 min, 4°C), das Proteinpräzipitat sedimentiert (15 min, 10000 x g), in 1 N NaOH aufgelöst und mit dest. H₂O 1:2 verdünnt. Da die Proteinproben in NaOH gelöst waren, wurde eine alkalifreie Reagenzlösung (Lowry C) verwendet.

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde durchgeführt wie vom Hersteller der sauren Coomassie-Blau-Lösung angegeben.

Für beide Methoden der Proteinbestimmung wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

B.9.2 Tyrosinsulfatnachweis

B.9.2.1 Qualitativer Nachweis tyrosinsulfatierter Proteine in Polyacrylamidgelen

Die Proteine wurden durch PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blau-Färbung im Gel fixiert. Anschließend wurden die Gele in eiskalter 1 N HCl äquilibriert und 5 min in 1 N HCl inkubiert, die auf 90°C erhitzt worden war. Die Hydrolyse wurde durch schnelles Abkühlen in eiskalter Entfärbelösung (s. B.5.3.1) gestoppt und freies Sulfat durch Waschen mit Entfärbelösung entfernt. Die Gele wurden fluorographiert. Durch Vergleich mit dem Fluorogramm unbehandelter Gelspuren wurden säurelabile sulfatierte Proteinbanden detektiert. (Huttner, 1984).

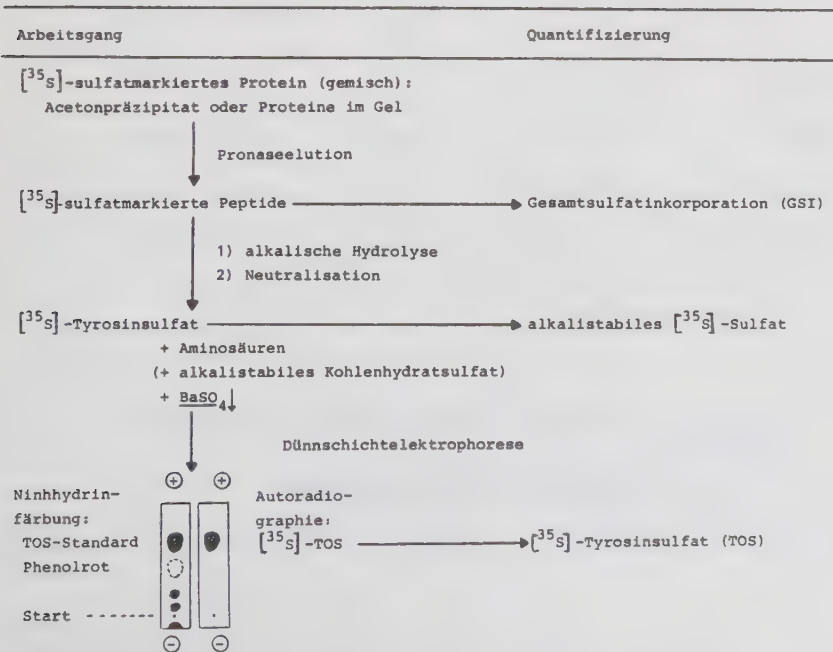
B.9.2.2 Quantitative Tyrosinsulfatanalyse

Der Nachweis von Tyrosinsulfat in Proteinen wurde durchgeführt wie von Huttner (1984) im Detail beschrieben. Eine Zusammenfassung des Arbeitsgangs gibt Abb. B.4. Proteine aus Zell- und Gewebshomogenaten wurden mit SDS-Probenpuffer gekocht und durch Acetonpräzipitation und mehrfaches Waschen des Präzipitats mit 80% Aceton von anorganischem Sulfat

befreit. Alternativ wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, anorganisches Sulfat durch Waschen der Gele mit Entfärbelösung entfernt und die Proteine durch Pronasehydrolyse aus dem Gel eluiert (10 µg/ml Pronase in 50 mM NH_4HCO_3). Um bei der Analyse ganzer Gelspuren das Elutionsvolumen klein zu halten, wurde in Einzelfällen die Elektrophorese nur solange durchgeführt, bis die Proben 2-3 cm in das Trenngel gelaufen waren.

Die Sulfatradioaktivität des Acetonpräzipitats bzw. der eluierten Peptide wurde durch Scintillationszählung bestimmt und als Gesamtsulfatinkorporation (GSI) bezeichnet. Die Proteine wurden alkalisch hydrolysiert (0,2 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 110°C, 20 h). Bei der anschließenden Neutralisation der Proben mit Schwefelsäure wurde das während der Hydrolyse aus alkalilabilem Kohlenhydratsulfat freigesetzte anorganische (^{35}S)-Sulfat als BaSO_4 präzipitiert. Etwa 80% eines parallel analysierten Tyrosinsulfatstandards blieben löslich im resultierenden neutralen Überstand. (^{35}S)-Tyrosinsulfat wurde durch Komigration mit unmarkiertem Aminosäurestandard auf Dünnschichtplatten identifiziert (s. B.9.3). Die tyrosinsulfathaltigen Regionen wurden ausgeschnitten und durch Scintillationszählung quantifiziert. Als Blindwert dienten Stücke der Dünnschichtplatte gleicher Größe, die vor und hinter dem Tyrosinsulfatfleck lagen. Die Ausbeute des Tyrosin-(^{35}S)-sulfatstandards auf der Dünnschichtplatte betrug je nach Hydrolyse 65- bis 85% der in die Bariumhydrolyse eingesetzten Menge. Die im Ergebnisteil angegebenen Werte von Tyrosinsulfat in Proteinproben sind jeweils bezüglich der Standardausbeute korrigiert.

Abb. B.4: Arbeitsschema zur Tyrosinsulfatanalyse (s. B.9.2.2)



B.9.2.3 Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung

Mit (^3H)-Tyrosin markierte Proteine wurden alkalisch hydrolysiert (s. B.9.2.2). Die Aminosäuren des neutralisierten Überstands wurden zweidimensional auf Dünnschichtplatten analysiert: Im Anschluß an die pH 3,5-Elektrophorese (s. Tabelle B.3) wurde eine aufsteigende Chromatographie mit einem Gemisch aus H_2O :Pyridin:Methanol (20:4:80) durchgeführt. (Bäuerle und Hüttner, 1985).

B.9.3 Analyse von Peptiden und Aminosäuren auf Zellulose-Dünnschichtplatten

Die Analyse von Aminosäuren und Peptiden wurde auf Zellulosedünnschichtplatten durchgeführt, wie im Detail von Hüttner (1984) beschrieben.

Tabelle B.3 zeigt Pufferzusammensetzung, Ort des Probenauftrags und die durchschnittlichen Elektrophoresezeiten.

Tabelle B.3: Elektrophoresebedingungen für die Analyse von Peptiden, Aminosäuren und Sulfat auf Zellulosedünnschichtplatten (s. B.9.3).

Analyse	Puffer		Probenauftrag (§)	Elektrophoreselauf	
	pH	Komponenten		Spannung	Zeitdauer
Tyrosin-sulfat	a) 3,5	Py : HAC : H_2O 0,5 : 5 : 94,5	Kathode (3 cm)	500 V	90 min
	b) 1,9	HFO : HAC : H_2O 2,2 : 7,8 : 90	Kathode (3 cm)	750 V	120 min
Tyrosin + T.-sulfat	3,5	Py : HAC : H_2O 0,5 : 5 : 94,5	Kathode (6 cm)	500 V	45 min
tryptische Peptide	1,55	HFO : HAC : H_2O 5 : 15 : 80	Anode (5 cm)	500 V	70 min
anorganisches Sulfat	3,5	Py : HAC : H_2O 0,5 : 5 : 94,5	Kathode (3 cm)	500 V	15 min

Abkürzungen: Py = Pyridin, HAC = Eisessig, HFO = Ameisensäure

(§): Die Angaben in cm geben den Abstand des Auftragepunkts vom Rand der Dünnschichtplatte an.

B.10 Detektion und Quantifizierung isotoopenmarkierter Substanzen

1) Autoradiographie und Fluorographie

Für die Autoradiographie und Fluorographie wurde Kodak

XAR5-Röntgenfilm verwendet.

Zur Verstärkung von (^{35}S)-Sulfat- und Tritiumradioaktivität wurden Polyacrylamidgele mit 1 M Natriumsalicylat imprägniert. Die Fluorographie erfolgte bei -70°C mit Kodak XAR5-Röntgenfilm (Chamberlain, 1979). Für den Nachweis von Tritiumradioaktivität auf Zellose dünn schichtplatten wurden die Platten mit EN 3 HANCE (NEF-970, NEN) behandelt und die Röntgenfilme bei -70°C exponiert.

Zum Nachweis von ^{125}J wurden Nitrozellulosefilter bzw. Dünnschichtplatten auf fluoreszenzverstärkenden Schirmen (Dupont, Cronex $^{\text{R}}$ Quanta III EK) bei -70°C exponiert.

2) Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine aus Polyacrylamidgelen

Die getrockneten Gelstücke wurden mit 1 ml 30% H_2O_2 depolymerisiert (5-10 Stunden, 70°C). Die Scintillationszählung wurde nach Zugabe von 10 ml Aqualuma durchgeführt.

Mit Natriumsalicylat imprägnierte Gelstücke wurden unter diesen Bedingungen nur unvollständig aufgelöst. Solche Proben wurden deshalb vor der Zählung 1 h lang gründlich durchmischt, um die Radioaktivität aus den geschwollenen Gelstücken zu eluieren.

C Ergebnisse und Diskussion

C.1 Spezifische Muster sulfatierter- und tyrosinsulfatierter Proteine in Geweben und Blutplasma der Ratte

C.1.1 Fragestellung

Ausgehend von der sekretorischen Natur aller bisher bekannten tyrosinsulfatierten Proteine (vgl. Abschnitt A.4.3) wurde die Arbeitshypothese formuliert, daß die Tyrosinsulfatierung als kovalente Modifikation möglicherweise selektiv nur in sekretorischen Proteinen vorkommt (Hille et al., 1984 und Huttner et al., 1986). Nach dieser Hypothese sollten tyrosinsulfatierte Proteine bevorzugt von Geweben mit hoher sekretorischer Aktivität produziert werden. Dazu zählen z.B. die Speicheldrüsen, Darm-schleimhäute und Pankreas, die Enzyme in den Verdauungstrakt sezernieren, sowie die Leber, die den größten Teil der Proteine des Blutplasmas sezerniert. Aus der Vielzahl von Geweben, die wie die Leber Proteine endokrin sezernieren, seien lediglich Schilddrüse, Nebennierenmark und die Langerhansschen Inseln der Pankreas erwähnt. Doch nicht nur diese klassischen sekretorischen Gewebe ("Drüsengewebe") sezernieren Proteine. Für den Aufbau der extrazellulären Matrix sezernieren praktisch alle Zellen - also beispielsweise auch Muskelzellen - Proteine, wenngleich in geringeren Mengen.

Die Nachweisbarkeit sekretorischer Proteine in den verschiedenen Zell- und Gewebetypen hängt nicht nur von der Menge der sezernierten Proteine ab, sondern auch von der Regulation des Sekretionsvorgangs. So werden die in der Leber synthetisierten

Plasmaproteine und die Proteine der extrazellulären Matrix unmittelbar nach ihrer Synthese sezerniert (konstitutive Sekretion, vgl. Abschnitt A.3.2). Sie kommen innerhalb der Zellen, in denen sie synthetisiert werden, nur in geringen Mengen vor. Die Verdauungsenzyme und viele endokrin sekretorische Proteine dagegen werden zunächst intrazellulär akkumuliert und erst nach Stimulation sezerniert (regulierte Sekretion, vgl. Abschnitt A.3.2), sodaß ihre Konzentration im Gewebe relativ hoch sein kann.

Um die Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden Ratten mit (^{35}S)-Sulfat markiert und der Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalt der Proteine verschiedener Gewebe und der Blutzellen untersucht. Zum Vergleich wurde der Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalt der Proteine des Blutplasmas, die fast ausschließlich sekretorische Proteine darstellen, analysiert. Um die Sulfatreduktion und Biosynthese von (^{35}S)-Methionin und (^{35}S)-Cystein durch Mikroorganismen zu verhindern, wurde unter sterilen Bedingungen mit keimfreien Ratten gearbeitet. Um auch Proteine mit niedrigen Syntheseraten zu markieren, wurde eine Langzeitmarkierung mit drei Injektionen in Abständen von 3- bis 8 Stunden durchgeführt. Das (^{35}S)-Sulfat wurde intraperitoneal injiziert, da die Ascitesflüssigkeit ein Reservoir darstellt, aus dem das radioaktiv markierte Sulfat langsam resorbiert und in das Blut transportiert wird. Demnach ist bei intraperitonealer Injektion - verglichen mit der intravenösen Injektion, die einer Pulsmarkierung gleichkommt, - ein über längere Zeit relativ konstanter Pegel der spezifischen Radioaktivität zu erwarten (Mulder, 1981). Im Anschluß an die

Abb. C.1: Gewebsspezifische Muster des Sulfateinbaus in Proteine und Proteoglykane der Ratte, 1: Analyse der Proteine aus Gewebshomogenaten, Blutzellen und Blutplasma.
 Ratten wurden in vivo mit (^{35}S) -Sulfat markiert (s. Methoden B.4.1) und die Proteine (jeweils 50 μg) aus Gewebshomogenaten, Blutzellen und Blutplasma unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE getrennt. Linke Spur: Proteinfärbung mit Coomassie Blau; rechte Spur: Fluorogramm. Le = Leber, Mi = Milz, Ni = Niere, Sm = Skelettmuskel, Di = Zwerchfell, Ov = Ovar, Te = Testis, Ep = Epididymis, Hy = Hypophyse, Hi = Hirn, Th = Schilddrüse, Sd = Submaxillarspeicheldrüse, Lc = mit Leukocyten angereicherte Fraktion der Blutzellen, Er = Erythrocyten, Pl = Blutplasma. Pfeile: a = Aktin, m = Myosin, t = Tubulin, 1 und 2 s. Text, 3 = Thyreoglobulin, 4 = Sekretogranin II. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Die Fluorographiezeiten betragen 2 Wochen (Le, Mi, Ni, Ov, Hy und Pl) bzw. 4 Wochen (Sm, Di, Te, Ep, Hi, Th, Sd, Lc und Er).

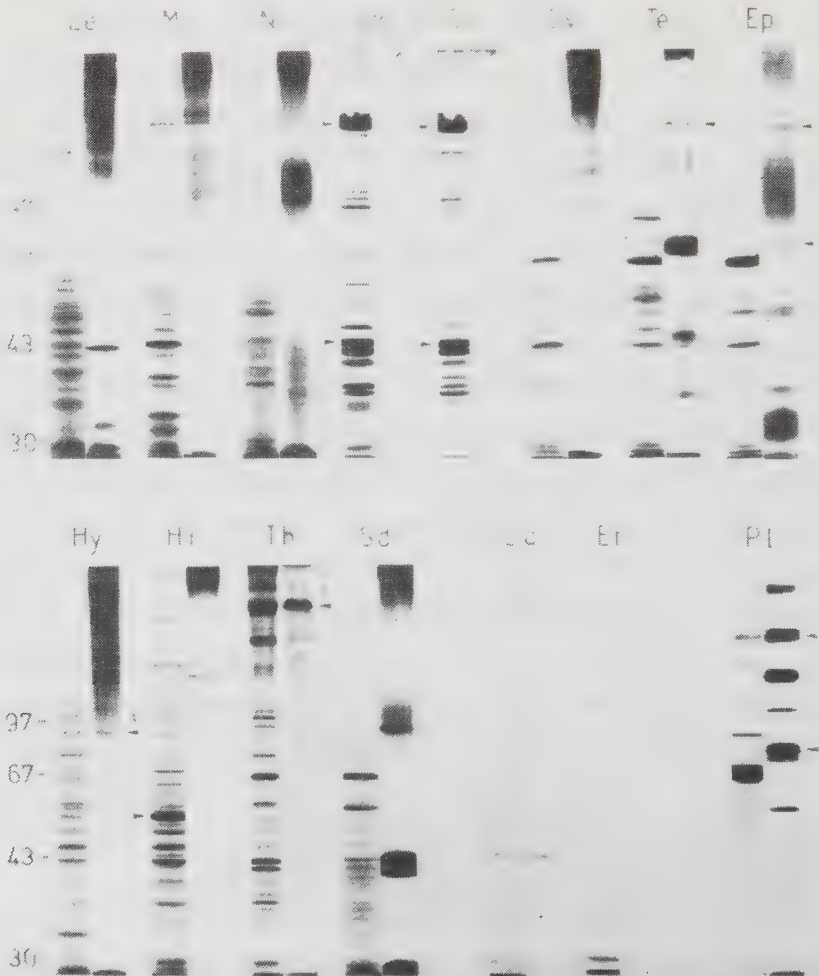
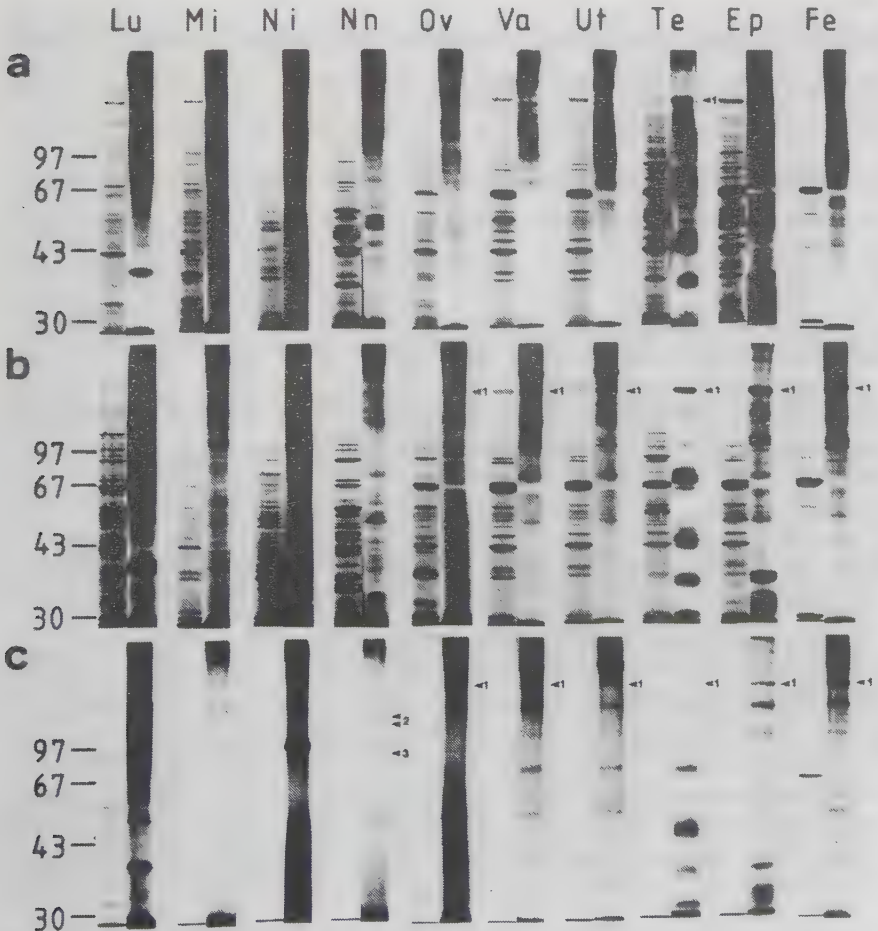


Abb. C.2: Gewebsspezifische Muster des Sulfateinbaus in Proteine und Proteoglykane der Ratte, 2: Vergleich der Proteine aus Gewebshomogenaten mit den löslichen bzw. hitzestabilen Proteinen.

Die Gewebe von in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markierten Ratten (s. Methoden B.4.1) wurden hypoton lysiert, ein löslicher Gewebeeextrakt und ein hitzestabiler Überstand hergestellt (s. Methoden B.4.2). Aliquots des Homogenats (a, jeweils $50\text{ }\mu\text{g}$ Protein), des löslichen Extrakts (b, $50\text{ }\mu\text{g}$ Protein) und des hitzestabilen Überstands (c, ein dem jeweiligen löslichen Extrakt entsprechendes Probenvolumen) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Linke Spur: Proteinfärbung mit Coomassie Blau; rechte Spur: Fluorogramm. Lu = Lunge, Mi = Milz, Ni = Niere, Nn = Nebenniere, Ov = Ovar, Va = Vagina, Ut = Uterus, Te = Testis, Ep = Epididymis, Fe = Fettgewebe. Pfeile: 1 = α_2 -Makroglobulin, 2 (3) = Sekretogranin I (II). Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Die Autoradiographiezeiten betrugen jeweils 4 Wochen (Lu bis Nn und Te bis Fe) bzw. 2 Wochen (Ov bis Ut).



Markierung wurden die Ratten perfundiert, um das Blut und damit die Plasmaproteine aus den Geweben zu entfernen.

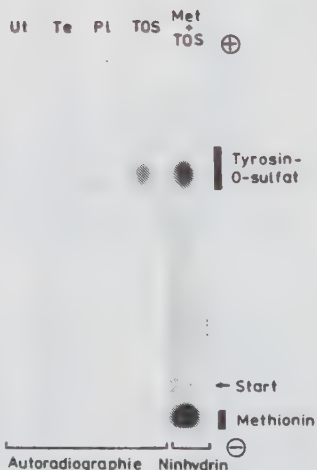
C.1.2 Ergebnisse

C.1.2.1 Gewebsspezifität des Sulfateinbaus in Proteine der Ratte

Die Proteine 17 verschiedener Gewebshomogenate wurden durch SDS-PAGE und anschließende Fluorographie analysiert (Abb. C.1 und C.2). Daß die detektierte (^{35}S)-Radioaktivität tatsächlich nur Sulfateinbau, nicht aber Methionin- und Cysteineinbau in Makromoleküle darstellte, zeigten folgende Beobachtungen: Erstens war das Muster der (^{35}S)-markierten Banden in den Fluorogrammen (Abb. C.1 und C.2, rechte Spur) völlig unterschiedlich von der jeweiligen Proteinfärbung (linke Spur), während bei in vivo-Markierung mit den Aminosäuren Methionin und Cystein die Mehrzahl der mit Coomassie Blau gefärbten Banden

Abb. C.3: Tyrosinsulfatanalyse von in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markierten Proteinen der Ratte.

Ratten wurden in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert (s. Methoden B.4.1). Die Proteine aus Uterus (Ut), Testis (Te) und Blutplasma (Pl) wurden mit Aceton präzipitiert und alkalisch hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden durch Dünnschicht-elektrophorese analysiert und Tyrosin-(^{35}S)-sulfat durch Autoradiographie nachgewiesen (s. Methoden B.9.2.2). Tyrosin-(^{35}S)-sulfat aus den Gewebs- und Plasmaproteinen komigrierte jeweils exakt mit zugemischtem, unmarkiertem Tyrosinsulfatstandard, der mit Ninhydrin gefärbt wurde (nicht gezeigt). Zum Vergleich sind die Positionen des Tyrosin-(^{35}S)-sulfatstandards (TOS) und der mit Ninhydrin gefärbten Tyrosinsulfat- und Methioninstandards (TOS + Met) abgebildet. Cystein läuft in derselben Position wie Methionin (nicht gezeigt). Der Pfeil bezeichnet den Probenauftrag, (+) und (-) die Orientierung der Elektroden.



radioaktiv markiert sein sollten. Zweitens war nach alkalischer Hydrolyse der Proteine und Analyse der Aminosäuren durch Dünnschichtelektrophorese keine (^{35}S)-Radioaktivität in der Position von Standardmethionin detektierbar (Abb. C.3).

Bei vielen Gewebshomogenaten war das Fluorogramm von einer diffusen Schwärzung durch sulfatierte Makromoleküle überzogen (Abb. C.1 und C.2a). Dabei handelte es sich vermutlich um Proteoglykane, die vom Molekulargewicht her heterogen sein können (s. Müller und Heilmann, 1984). Zur besseren Analyse der sulfatierten Proteine wurden einige dieser Gewebe hypoton lysiert und ein löslicher Extrakt (100 000 x g - Überstand) sowie ein hitzestabiler Überstand hergestellt (s. Methoden B.4.2). Durch die Extraktion und Hitzebehandlung konnte ein Teil der Proteoglykane entfernt werden, und einige sulfatierte Banden waren deutlicher sichtbar (Abb. C.2b, c). Der lösliche Extrakt und der hitzestabile Überstand enthielten zwar nicht immer das vollständige Spektrum der im Homogenat sichtbaren sulfatierten Banden (z.B. Abb. C.2, Mi), doch illustrieren die Fluorogramme, daß auch diese Gewebe Sulfat in Proteine verschiedener Molekulargewichtsbereiche eingebaut hatten, welche im Homogenat von Proteoglykanen überdeckt waren.

Jedes untersuchte Gewebe besaß ein charakteristisches Muster sulfatierter Proteine und Proteoglykane (Abb. C.1 und C.2). Während sich die Fluorogramme der meisten Gewebe markant voneinander unterschieden, lieferten verwandte Gewebe ähnliche Muster sulfatierter Makromoleküle. Besonders ausgeprägt war die Ähnlichkeit verschiedener Muskelgewebe wie Skelettmuskel und

Zwerchfell (Abb. C.1, SM und Di). Auch die Geschlechtsorgane besaßen neben den für jedes Organ spezifischen Banden eine Reihe gemeinsamer sulfatierter Makromoleküle (Abb. C.2, Ov, Va, Ut, Te und Ep, Pfeil 1). Aktin, Myosin und Tubulin, drei abundante cytoplasmatische Proteine, die nach Proteinfärbung anhand ihres Molekulargewichts identifiziert werden konnten, enthielten keine nachweisbaren Mengen an (^{35}S)-Sulfat (Pfeile a, m bzw. t in Abb. C.1). Im Gegensatz dazu waren einige sekretorische Proteine, die in den Gewebshomogenaten identifiziert werden konnten, sulfatiert (Sekretogranin I und II der Nebenniere, Pfeile 2 und 3 in Abb. C.2c, Sekretogranin II der Adenohypophyse, Pfeil 4 in Abb. C.1 und Thyreoglobulin der Schilddrüse, Pfeil 3 in Abb. C.1). Bemerkenswert war die Vielzahl sulfatierter Banden bei den ins Blutplasma sezernierten Proteinen (Abb. C.1, Pl). Auch die Leukocyten enthielten einige sulfatierte Banden (Abb. C.1, Lc). Dagegen war bei den im Blut zirkulierenden Erythrocyten, die weder Proteine synthetisieren noch sezernieren (Alberts et al., 1983b), kein Sulfateinbau nachweisbar (Abb. C.1, Er).

C.1.2.2 Die Tyrosinsulfatierung, eine häufige Modifikation sekretorischer Proteine des Blutplasmas

Die in Abb. C.1 und C.2 dargestellten Fluorogramme unterscheiden nicht zwischen den zwei Typen der Sulfatesterbindung, nämlich der Bindung an Tyrosin und an Kohlenhydratbestandteile von Proteinen und Proteoglykanen (vgl. Abschnitt A.4.1). Deshalb wurden die Proteine aus Gewebshomogenaten, Blutzellen und Blutplasma einer Tyrosinsulfatanalyse unterworfen: Die Proteine wurden mit Aceton

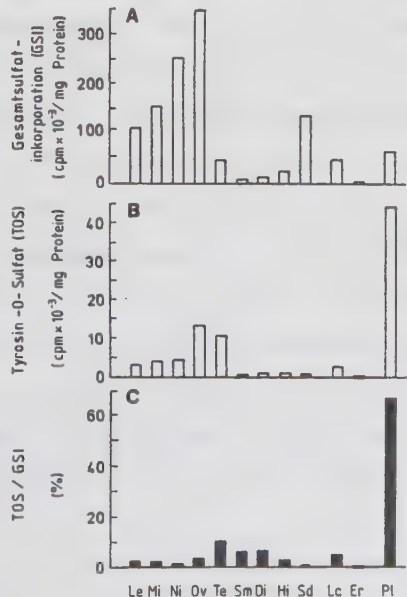
präzipitiert, um anorganisches Sulfat zu entfernen, und die Gesamtsulfatinkorporation (GSI) in Makromoleküle, d.h. die (^{35}S)-Radioaktivität im gewaschenen Acetonpräzipitat bestimmt. Anschließend wurden die Proteine alkalisch hydrolysiert und Tyrosinsulfat (TOS) durch Dünnschichtelektrophorese identifiziert und quantifiziert.

Bezüglich der Gesamtsulfatinkorporation waren zwischen verschiedenen Geweben und den Blutzellen große Unterschiede zu beobachten (Abb. C.4A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluorographie war die Sulfatinkorporation sehr hoch bei jenen Geweben, die viel sulfatierte Proteoglykane enthielten, z.B. bei Niere und Ovar (Abb. C.4, Ni, Ov). In Erythrocyten war keine Sulfatinkorporation nachweisbar, d.h., freies und nicht kovalent gebundenes Sulfat war durch die Acetonpräzipitation vollständig entfernt worden. Der größte Teil des in Proteine aus Geweben und Leukocyten inkorporierten Sulfats wurde bei der alkalischen Hydrolyse abgespalten und als Bariumsulfat präzipitiert, war also vermutlich an Kohlenhydrate gebunden (Huttner 1984).

Abb. C.4: Vergleich des (^{35}S)-Sulfat- und Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalts der Proteine und Proteoglykane verschiedener Gewebe, der Blutzellen und des Blutplasmas der Ratte.

Ratten wurden in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert (s. Methoden B.4.1). Die (^{35}S)-sulfatmarkierten Makromoleküle aus Geweben, Blutzellen und Blutplasma wurden mit Aceton präzipitiert, die Gesamt-(^{35}S)-Sulfatinkorporation (GSI, Graph A) und der Tyrosin-O-(^{35}S)-Sulfatgehalt (TOS, Graph B) bestimmt (s. Methoden B.9.2.2). (C): Anteil des Tyrosin-O-(^{35}S)-Sulfats an der Gesamt-(^{35}S)-sulfatinkorporation (TOS/GSI $\times 100$).

Abkürzungen s. Abb. C.1.



Die Plasmaproteine nahmen bezüglich der Gesamtsulfatinkorporation eine Mittelstellung ein (Abb. C.4A, Pl). Die Menge an (^{35}S)—Tyrosinsulfat dagegen war in den Plasmaproteinen 5- bis 50 mal höher als in allen untersuchten Geweben, und zwar sowohl auf Protein bezogen (cpm TOS/mg Protein) als auch bezogen auf den Gesamtsulfateinbau (cpm TOS/cpm GSI) (Abb. C.4B und C, Pl).

Daß es sich bei dem in den Proteinproben nachgewiesenen Tyrosinsulfat ausschließlich um proteingebundenes und nicht um kopräzipitiertes, freies Tyrosinsulfat handelte, zeigte folgendes Kontrollexperiment: nicht markiertes Blutplasma wurde mit (^{35}S)-Tyrosinsulfatstandard gemischt, die Proteine mit Aceton präzipitiert und die (^{35}S)-Radioaktivität im Proteinpräzipitat und im Acetonüberstand bestimmt. Dabei wurden 96% des Tyrosinsulfatstandards (3500 ± 80 cpm aus 3650 ± 35 cpm) im Acetonüberstand wiedergefunden. Es fand also keine signifikante Kopräzipitation von freiem Tyrosinsulfat statt.

Um zu klären, ob die Unterschiede in der Gesamtsulfatinkorporation durch unterschiedliche Versorgung der Gewebe mit (^{35}S)-Sulfat zustandekamen, wurde in den Homogenaten ausgewählter Gewebe die Menge an anorganischem (^{35}S)-Sulfat bestimmt (Tabelle C.1). Es war keine Korrelation festzustellen zwischen der Konzentration an anorganischem (^{35}S)-Sulfat in Geweben bzw. im Blutplasma und der Gesamtsulfatinkorporation in die entsprechenden Proteine (vgl. Tabelle C.1 und Abb. C.4A). So betrug beispielsweise die Konzentration an anorganischem Sulfat in der Niere nur 35% des Werts in der Leber, während der Sulfateinbau in die Proteine der Niere 2,5-mal höher lag als bei

den Proteinen der Leber.

Tabelle C.1: Konzentrationen von anorganischem (^{35}S)-Sulfat in Geweben und im Blutplasma der Ratte nach in vivo-Markierung.

Die Gewebshomogenate der mit (^{35}S)-Sulfat markierten Ratten (s. Methoden B.4.1 und .2) wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen verdünnt und Proteine durch Acetonpräzipitation entfernt. Anorganisches (^{35}S)-Sulfat im Acetonüberstand wurde durch Dünnschichtelektrophorese und Komigration mit Sulfatstandard identifiziert und durch Szintillationszählung quantifiziert (s. Methoden B.9.3).

	$^{35}\text{SO}_4$ (cpm/mg Protein)
Leber	4 690
Niere	1 650
Hirn	160
Speicheldrüse	2 930
Blutplasma	34 700

In Anbetracht der großen Menge von Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in Plasmaproteinen stellte sich die Frage nach der Lokalisation der an der Sulfatierung der Plasmaproteine beteiligten Tyrosylproteinsulfotransferasen. Werden die Plasmaproteine während ihrer Biosynthese durch intrazelluläre Sulfotransferasen sulfatiert oder erst nach ihrer Sekretion - durch bisher nicht charakterisierte, im Blutplasma zirkulierende Enzyme? Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, ob die Proteine des Blutplasmas in vitro mit (^{35}S)-Sulfat markierbar sind. Heparinisiertes Blut bzw. Blutplasma von Ratten wurde 15 Stunden lang mit (^{35}S)-Sulfat inkubiert. Anschließend wurde das Blutplasma beider Ansätze durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Bei der in vitro-Sulfatmarkierung von Blutplasma war überhaupt kein Sulfateinbau in die Plasmaproteine nachweisbar (Abb. C.5b). Bei der Markierung von Blut wurden geringe Mengen von Sulfat in Makromoleküle inkorporiert (Abb. C.5a, Pfeil). Es

Abb. C.5: In vitro-Markierung von Blut und Blutplasma der Ratte mit (^{35}S)-Sulfat.

Heparinisiertes Blut (a) bzw. Blutplasma (b) wurde 15 Stunden lang unter sterilen Bedingungen mit (^{35}S)-Sulfat markiert (s. Methoden B.4.3). Die spezifische Radioaktivität betrug $9 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ Plasmaprotein, verglichen mit $1 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ bei der in vivo-Sulfatmarkierung (vgl. Methoden B.4.1). Im Anschluß an die Markierung wurden die Blutzellen abzentrifugiert und Aliquots des Blutplasmas ($100 \mu\text{g}$ Protein) unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE analysiert. Als Vergleich dienten $50 \mu\text{g}$ Plasmaproteine einer in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markierten Ratte (c). Abgebildet sind die Fluorogramme nach jeweils 4 Wochen Exposition. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben.

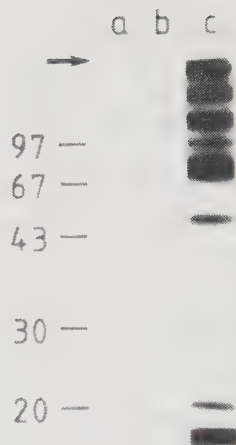


Abb. C.6: Tyrosinsulfatanalyse von Proteinen aus in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markierten Ratten.

Ratten wurden in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert (s. Methoden B.4.1) und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Links: Fluorogramm der Proteine (je $50 \mu\text{g}$) aus Epididymis (Ep) und Blutplasma (Pl) (10% Acrylamid im Trenngel). Die Proteine wurden fixiert und jeweils eine Gelspur (+) mit 1 N HCl bei 100°C inkubiert, um die Tyrosinsulfatesterbindung zu hydrolysieren (s. Methoden B.9.2.1); (-): unbehandelte Kontrolle.

Rechts: Fluorogramm derselben Plasmaprobe wie links nach Trennung im SDS-Gel mit 7,5% Polyacrylamid. Die Linien verbinden entsprechende Proteinbanden. Das Gel wurde in 20 gleichgroße Stücke geschnitten, in denen jeweils die Gesamtsulfatinkorporation (dargestellt durch die Gesamtlänge der horizontalen Balken) und Tyrosinsulfat (dargestellt durch den schattierten Teil der Balken) bestimmt wurden (s. Methoden B.9.2.2). Die leichte Überausbeute an Tyrosinsulfat in der 4. und 5. Säule von 3,5% bzw. 7% lag innerhalb der Fehlergrenzen der Analysemethode. Pfeile: 1 und 2 = tyrosinsulfatierte Proteinbanden, 3 = überwiegend an Kohlenhydraten sulfatiertes Plasmaprotein.



war jedoch kein Sulfateinbau in diejenigen Plasmaproteine nachweisbar, die in vivo mit Sulfat markiert worden waren (vgl. Abb. C.5a und c). Die Sulfatierung der Proteine des Blutplasmas findet also vor ihrer Sekretion statt, und zwar nur zum geringeren Teil durch Blutzellen (Abb. C. 5a), sondern überwiegend in Geweben, wie z.B. in der Leber (vgl. auch die Identifizierung der in der Leber synthetisierten, sulfatierten Plasmaproteine Fibrinogen und α_2 -Makroglobulin, Abschnitt C.1.2.3).

Für eine genauere Tyrosinsulfatanalyse wurden die Plasmaproteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von Tyrosinsulfat verwendet:

1) Einzelne Proteinbanden wurden durch Pronase aus dem Gel eluiert, alkalisch hydrolysiert und Tyrosinsulfat durch Dünnschichtelektrophorese nachgewiesen. Abb. C.6 (rechts) zeigt, daß die meisten Proteinbanden das inkorporierte Sulfat überwiegend in der Form von Tyrosinsulfat enthalten. Die Summation der Einzelwerte für die Gesamtsulfatinkorporation und den Tyrosinsulfatgehalt aller Gelstücke ergab, daß 62% des Sulfats als Tyrosinsulfat vorlagen. Dieser Wert stimmt gut überein mit der Tyrosinsulfatanalyse acetonpräzipitierter Plasmaproteine (vgl. Abb. C.4C).

2) Die Plasmaproteine wurden im Polyacrylamidgel mit 1 N HCl auf 100°C erhitzt. Dieses Verfahren hydrolysiert selektiv Tyrosinsulfat, nicht aber die meisten Kohlenhydratsulfatester (Huttner, 1984). Die Säurebehandlung entfernte den überwiegenden Teil der (^{35}S)-Sulfatmarkierung bei den meisten sulfatierten

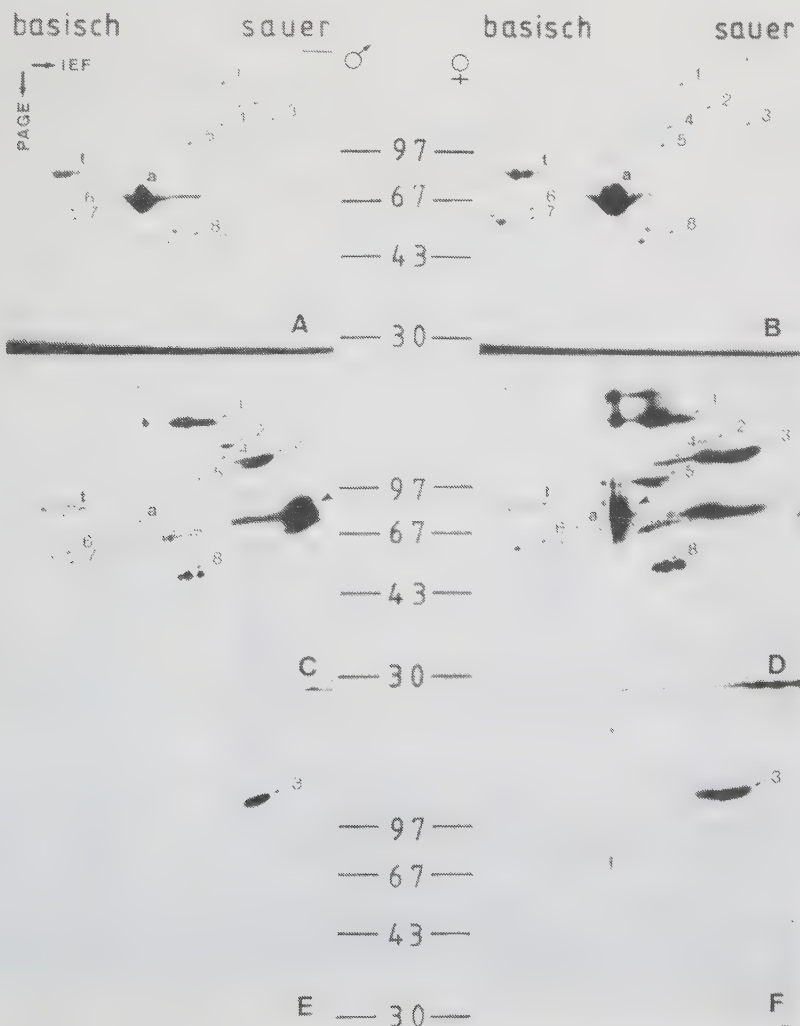
Plasmaproteinen (Abb. C.6, P1 und Abb. C.7E, F). Die Säurelabilität der Sulfatgruppen einzelner Plasmaproteine korrelierte mit den Ergebnissen des Tyrosinsulfatnachweises durch Dünnschichtelektrophorese: die einzige prominente säurestabile Bande (Molekulargewicht ca. 125 kD) enthielt nur 26% des Sulfats als Tyrosinsulfat (Pfeil 3 in Abb. C.6 und C.7).

Im Gegensatz zu den Plasmaproteinen war bei den meisten Gewebsproteinen die (^{35}S)-Sulfatmarkierung säurestabil, wie exemplarisch anhand der Proteine des Epididymis gezeigt ist (Abb. C.6, Ep). Auch dieses Ergebnis stimmt überein mit der Tyrosinsulfatanalyse acetonpräzipitierter Makromoleküle (Abb. C.4B). Einige säureempfindliche sulfatierte Banden in Geweben, z.B. im Epididymis, komigrierten mit tyrosinsulfatierten Plasmaproteinen (Pfeilspitzen 1 und 2 in Abb. C.6). Ihr Vorkommen in Geweben kann jedoch nicht durch unvollständige Perfusion und damit Zurückbleiben von Blut in den Geweben erklärt werden, da selektiv nur bestimmte sulfatierte Plasmaproteine in diesen Geweben beobachtet wurden (s. Diskussion, Abschnitt C.1.3.3).

C.1.2.3 Identifizierung einiger Plasmaproteine

Zur Identifizierung wurden die Plasmaproteine zweidimensional aufgetrennt, mehrere Proteine immunpräzipitiert und das Laufverhalten einzelner Proteine in der SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen verglichen.

Abb. C.7 zeigt die Gele zweidimensional aufgetrennter Plasmaproteine einer männlichen (links) und einer weiblichen Ratte (rechts). Fast alle tyrosinsulfatierten Plasmaproteine waren



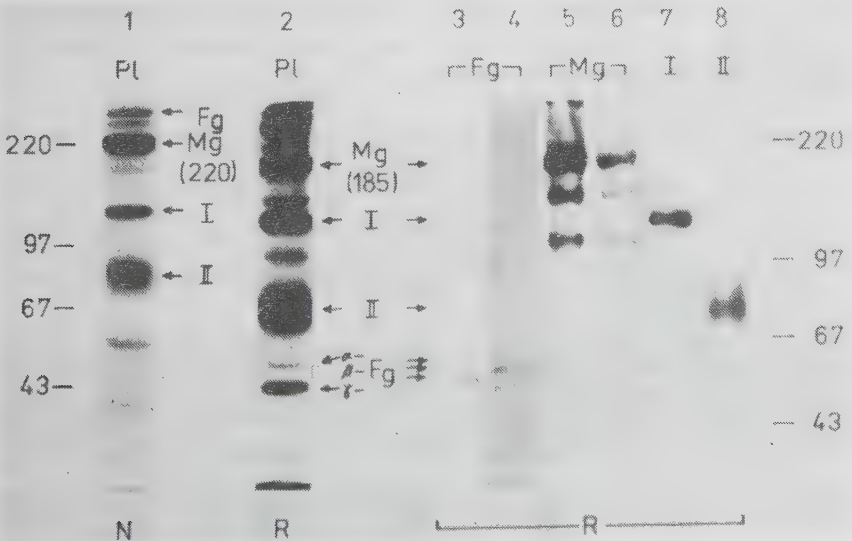
gleichzeitig durch Färbung mit Coomassie Blau nachweisbar, d.h., sie lagen in relativ hohen Konzentrationen vor. Bei Annahme einer Nachweisgrenze der Coomassie Blau-Färbung von $1 \mu\text{g}$ Protein betrug der Anteil der schwächsten gerade noch färbbaren Bande ca. 0,3% der gesamten Plasmaproteine. Die meisten tyrosinsulfatierten Proteine kamen in beiden Ratten vor (vgl. nummerierte Pfeile in Abb. C.7C und D). Lediglich eine tyrosinsulfatierte Bande mit einem Molekulargewicht von 70 bis 75 kD fokussierte bei der männlichen Ratte am sauren Ende des Gels, bei der weiblichen dagegen in der Gegend von Albumin (Pfeilspitzen in Abb. C.7C und D). Dabei könnte es sich möglicherweise um ein geschlechtsspezifisches Protein handeln.

Der Vergleich mit der zweidimensionalen Auftrennung menschlicher Plasmaproteine (Anderson und Anderson 1977) zeigte, daß ein sehr abundantes tyrosinsulfatiertes Plasmaprotein der Ratte mit einem Molekulargewicht von 185 kD in ähnlicher Position wie menschliches α_2 Makroglobulin lief (Abb. C.7, Pfeil 1). Ein zusätzlicher Hinweis, daß diese Proteinbande α_2 Makroglobulin darstellt, ergab sich aus ihrem elektrophoretischen Laufverhalten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen: Im nicht reduzierenden SDS-Gel war anstatt der 185 kD-Bande eine Bande mit höherem apparentem Molekulargewicht (ca. 220 kD) zu beobachten (Abb. C.8, Pfeil Mg in Spur 1). Reelektrophorese dieser Proteinbande unter reduzierenden Bedingungen lieferte drei Banden: die Hauptbande lief in der Position von 185 kD, zwei niedermolekulare Banden von geringerer Intensität waren vermutlich Degradationsprodukte (Abb. C.8, Spur 5 und 6). Diese Verschiebung des apparenten Molekulargewichts nach Reduktion

stimmt überein mit dem elektrophoretischen Laufverhalten von menschlichem α_2 Makroglobulin (Marshall, 1984) und ist vermutlich auf das Vorhandensein intramolekularer Cystinbrücken zurückzuführen.

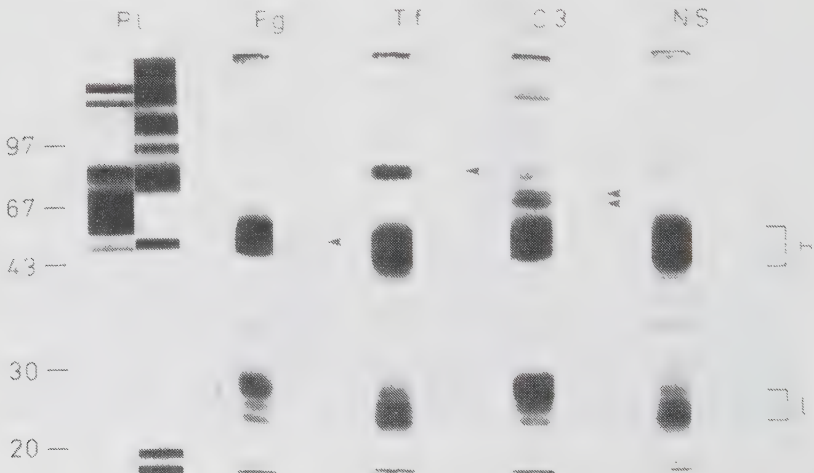
Abb. C.8: Identifizierung von α_2 -Makroglobulin und Fibrinogen im Blutplasma durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen.

Ratten wurden mit (^{35}S)-Sulfat markiert und die Plasmaproteine (Pl) unter nicht reduzierenden (Spur 1) (Probenpuffer ohne β -Merkaptoäthanol) oder reduzierenden Bedingungen (Spur 2) durch SDS-PAGE aufgetrennt. Einzelne Banden wurden aus dem nicht reduzierenden Gel ausgeschnitten, die Gelstücke mit reduzierendem Probenpuffer äquilibriert und die Proteine einer Reelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen unterworfen (Spur 3-8). Die nicht reduzierende (N) und die reduzierende (R) Elektrophorese wurden auf zwei separaten Gelen durchgeführt, daher unterscheiden sich die Positionen der Standardproteine von Spur (1) (links angegeben) und Spur (2-8) (rechts angegeben). Der Standard für 220 kD war nicht reduziertes Ferritin, übrige Standards s. Methoden B.5.2.1. (Fg): Fibrinogen, (Mg): α_2 -Makroglobulin, (I) und (II): nicht identifizierte, sulfatierte Proteine. Spur (1)-(3), (5), (7) und (8): Fluorogramme, Spur (4) und (6): Proteinfärbung mit Coomassie Blau.



(Nachdem diese Untersuchungen durchgeführt worden waren, wurden unabhängige Ergebnisse veröffentlicht, nach denen beim menschlichen α_2 -Makroglobulin, das aus Hepatokarzinomzellen (HepG2) sezerniert wird, kein Tyrosinsulfat nachweisbar ist (Liu et al., 1985). Die Diskrepanz zwischen beiden Ergebnissen könnte auf Speciesunterschiede oder veränderte Eigenschaften der Tumorzellen im Vergleich zu normalen Leberzellen zurückzuführen sein.)

Abb. C.9: Identifizierung von Plasmaproteinen der Ratte durch Immunpräzipitation. Plasmaproteine (1 mg) von (^{35}S)-sulfatmarkierten Ratten (Methoden B.4.1) wurden in einem Gesamtvolumen von 380 μl mit 50 μl Antiseren gegen Fibrinogen (Fg), Transferrin (Tf) und Komplement C3 (C3) inkubiert, die Immunkomplexe durch Adsorption an Staphylococcus aureus-Zellen isoliert (45 min, 4°C) (s. Methoden B.7.5.2) und durch SDS-PAGE analysiert. Linke Spur: Proteinfärbung mit Coomassie Blau, rechte Spur: Fluorogramm. Pl: gesamtes Plasma als Ausgangsmaterial (200 μg Protein), NS: Kontrollpräzipitation mit Ziegennormalserum. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links und die Position von IgG ist rechts angegeben (H: H-Kette, L: L-Kette). Pfeilspitzen: Position der spezifisch präzipitierten Proteine Fibrinogen, Transferrin und Komplement C3. Für die Immunpräzipitation von Fg und C3 wurden Ziegenantiseren, für die Präzipitation von Tf Kaninchenantiseren verwendet, daher die Abweichung im Molekulargewicht der Immunglobuline. Das Autoradiogramm der Kontrollpräzipitation mit Kaninchennormalserum entsprach der Kontrolle mit Ziegennormalserum (nicht gezeigt).



Fibrinogen wurde durch Immunpräzipitation und durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen identifiziert. Bei der abgebildeten eindimensionalen Gelelektrophorese des Immunpräzipitats wurden die Untereinheiten des Fibrinogens nicht voneinander getrennt, da sie von der Immunglobulinbande des Antiserums zusammengedrängt wurden (Abb. C.9, Fg). Dagegen trennten sich bei der Reelektrophorese des durch nicht reduzierende SDS-PAGE gereinigten Fibrinogens deutlich die α -, β - und γ -Kette (Abb. C.9, Spur 3 und 4). Die α - und γ -Kette waren stärker sulfatiert als die β -Kette, die in diesem Gel nur durch Proteinfärbung nachweisbar war. Zweidimensional PAGE, bei der mehr Protein eingesetzt wurde, zeigte, daß auch die β -Untereinheit sulfatiert war (Abb. C.7, Pfeil 7).

Serumalbumin und Transferrin konnten anhand ihrer hohen Konzentration im Serum (gezeigt durch Coomassie Blau-Färbung), aufgrund ihres Molekulargewichts und durch Vergleich mit dem zweidimensionalen Muster menschlicher Plasmaproteine (Anderson und Anderson, 1977) identifiziert werden (Abb. C.7 a und t). Transferrin wurde zusätzlich durch ein käufliches Antiserum gegen Rattentransferrin immunpräzipitiert. Es wurde spezifisch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 82 ± 4 kD präzipitiert (Abb. C.9, Tf), dessen isoelektrischer Punkt im Basischen lag (nicht gezeigt, vgl. Abb. C.7). Weder bei Albumin noch bei Transferrin war nach der Langzeitmarkierung Einbau von (^{35}S)-Sulfat nachweisbar. Dies ist nicht auf eine langsame Syntheserate zurückzuführen, da beide Proteine unter vergleichbaren Bedingungen (^{35}S)-Methionin und (^{35}S)-Cystein einbauen (Huttner, unveröffentlicht).

Bei Komplement C4 aus menschlichem Plasma wurde Tyrosinsulfat als kovalente Modifikation nachgewiesen (Karp, 1983). Die zweidimensionale PAGE der Plasmaproteine der Ratte zeigte in der entsprechenden Molekulargewichtsregion (ca. 80 kD) mehrere Proteinbanden. Da jedoch kein Antiserum gegen Ratten-Komplement C4 zur Verfügung stand, konnte das Protein im sulfatmarkierten Blutplasma nicht identifiziert werden. Immunpräzipitation mit Antiserum gegen das nahe verwandte Protein Komplement C3 lieferte spezifisch eine Proteinbande mit apparentem Molekulargewicht von 70 kD in Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht der β -Untereinheit bzw. einem Hydrolyseprodukt der α -Untereinheit (C3c) von menschlichem Komplement C3 (Müller-Eberhard, 1975). Es war kein Sulfateinbau in immunpräzipitiertes Komplement C3 nachweisbar (Abb. C.9, C3). Dieses Ergebnis wurde inzwischen durch zwei von meinen Arbeiten unabhängige Publikationen bestätigt: Karp (1983) und Hortin et al. (1986a) konnten bei menschlichem Komplement C3 ebenfalls keinen Sulfateinbau beobachten.

C.1.3 Diskussion

Um das Vorkommen tyrosinsulfatierter Proteine zu untersuchen, wurde eine in vivo-Isotopenmarkierung von Ratten, also von Gesamtorganismen durchgeführt. Die Isotopenmarkierung mit (^{35}S)-Sulfat stellt die empfindlichste Methode für den Tyrosinsulfatnachweis dar. Die Untersuchung des Gesamtorganismus bot im Vergleich zur Verwendung von Zellkulturen den Vorteil, daß die Gewebe unter in situ-Bedingungen markiert wurden, daß also

keine Abweichungen vom Normalzustand zu erwarten waren, wie sie bei transformierten Zellkulturen nicht ausgeschlossen werden können. In allen untersuchten Geweben der Ratte wurden tyrosinsulfatierte Proteine gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt die weite Verbreitung der Tyrosinsulfatierung von Proteinen, wie sie bereits von Huttner (1982) beschrieben wurde. Im Vergleich zu den früheren Untersuchungen ermöglichte die Verwendung keimfreier Ratten eine bessere Analyse des Sulfateinbaus. Da weder Einbau von (^{35}S)-Methionin noch von (^{35}S)-Cystein nachweisbar war, konnten die sulfatierten Proteine und Proteoglykane nach Trennung in Polyacrylamidgelen durch Fluorographie direkt sichtbar gemacht werden, was die Identifizierung sulfatmarkierter Proteinbanden erleichterte. Darüberhinaus konnte die Sulfatinkorporation in Proteine und Proteoglykane unmittelbar durch Scintillationszählung acetonepräzipitierter Makromoleküle quantifiziert werden.

Für die Beurteilung der Topographie tyrosinsulfatierter Proteine waren zwei Ergebnisse von Bedeutung: der fehlende Sulfateinbau in Erythrocyten (s. Abschnitt C.1.3.1) sowie der hohe Gehalt an Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in Plasmaproteinen, die fast ausschließlich sekretorische Proteine darstellen (s. Abschnitt C.1.3.2).

C.1.3.1 Das Fehlen der Tyrosinsulfatierung in Erythrocyten

In den reifen, im Blut zirkulierenden Erythrocyten, die keine Proteine synthetisieren (Alberts et al., 1983c), war kein Einbau von (^{35}S)-Sulfat in Proteine und dementsprechend auch kein Tyrosin-(^{35}S)-sulfat nachweisbar (s. Abb. C.4). Im Gegensatz

dazu sind reversible cytoplasmatische Proteinmodifikationen in Erythrocyten nachweisbar, wie für Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen gezeigt wurde (Palmer und Verpoorte, 1971). Die Phosphatgruppen der betreffenden Proteine können bei in vivo-Markierungsexperimenten durch (^{32}P)-Phosphat ausgetauscht werden. Das Fehlen des Sulfateinbaus in Erythrocytenproteine zeigt also, daß die Sulfatierung, einschließlich der Tyrosinsulfatierung, zumindest in diesem Zelltyp keine reversible cytoplasmatische Proteinmodifikation darstellt. (vgl. Abschnitt A.4.4).

Da die reifen Erythrocyten keine Zellorganellen, also auch keinen Golgi-Apparat besitzen (Alberts et al., 1983c), steht das Fehlen des Sulfateinbaus in Erythrocyten im Einklang mit der durch Zellfraktionierung festgestellten Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase im Golgi-Apparat (vgl. Abschnitt A.4.2). Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß Erythrocyten dennoch tyrosinsulfatierte Proteine besitzen, die in den Erythroblasten unmittelbar nach ihrer Biosynthese sulfatiert werden, und deren Sulfatgruppe als irreversible Modifikation bis zur Degradation der Proteine erhalten bleibt. Solche Proteine würden unter den gewählten Markierungsbedingungen nicht erfaßt.

C.1.3.2 Die Tyrosinsulfatierung, eine häufige Modifikation sekretorischer Proteine des Blutplasmas

Beim Vergleich des Sulfateinbaus in Proteine aus Geweben, Blutzellen und Blutplasma war das auffälligste Ergebnis die hohe Menge von Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in Proteinen des Blutplasmas, die

fast ausschließlich sekretorische Proteine darstellen: der Tyrosinsulfatgehalt der Plasmaproteine lag 5- bis 50mal höher als in den untersuchten Geweben (Abb. C.4B). Auch die Leber, in der die meisten Plasmaproteine - einschließlich der tyrosinsulfatierten Proteine Fibrinogen und α_2 Makroglobulin - synthetisiert werden, enthielt sehr wenig proteingebundenes Tyrosin-(^{35}S)-sulfat. Dies stellt keinen Widerspruch zu der großen Menge an Tyrosinsulfat in Plasmaproteinen dar, denn die in der Leber synthetisierten Plasmaproteine werden ohne vorherige intrazelluläre Speicherung schnell auf dem konstitutiven Weg sezerniert (Strous und Lodish, 1980).

Bei der Beurteilung dieser Daten ist zu berücksichtigen, daß die Quantifizierung von proteingebundenem Tyrosin-(^{35}S)-sulfat nach 15 Stunden Markierung keine Absolutwerte für die Konzentrationen sulfatierter Proteine liefert, sondern Einbauraten. Da die Tyrosinsulfatierung von Proteinen als irreversible Modifikation (vgl. Abschnitt A.4.4 und Ergebnisse in Abschnitt C.3.2) zeitlich unmittelbar nach der Proteinbiosynthese stattfindet, können die Sulfateinbauraten von den Turnoverraten der untersuchten Proteine abhängig sein. Für Proteine mit sehr langsamem Turnover (vgl. Tabelle C.2 und C.3) wären zum Erreichen des Steady State längere Markierungszeiten als 15 Stunden erforderlich. Experimentell würde dies jedoch einen großen Aufwand bedeuten, da Sulfat vom Organismus relativ schnell durch die Niere ausgeschieden wird (Mulder, 1981) und eine Verlängerung der Markierungszeit wiederholte Injektionen von (^{35}S)-Sulfat erfordert.

Tabelle C.2: Proteinsyntheseraten in Rattengewebe (nach Garlick, 1980).

Ratten wurden isotoopenmarkierte Aminosäuren injiziert und die Proteinsyntheseraten (K_s) einzelner Gewebe wie folgt bestimmt: $K_s = 100 \times S_B / (S_A \times t)$, S_A = spezifische Radioaktivität des Aminosäurepools, S_B = spezifische Radioaktivität der Gewebsproteine, t = Zeit in Tagen.

Gewebe	Syntheserate K_s (%/Tag)
Leber	87
Milz	76
Niere	48
Muskel	13
Hirn	17
Lunge	33

Tabelle C.3: Halblebenszeiten einzelner Proteine (a) und Proteinfraktionen (b) der Leber (nach Schimke und Bradley, 1975).

Abk.: LDH = Lactatdehydrogenase, cyt. = Cytochrom,

HMGCoA = Hydroxymethylglutaroyl-Coenzym A.

a

protein	Zellkompartiment	Halblebenszeit
Ornithindecarboxylase	Cytosol	10 min
LDH ₅	Cytosol	16 Tage
Katalase	Peroxisom	1,4 Tage
Cyt.c-Reduktase	ER	2,5-3,3 Tage
Cyt.b ₅	ER	4,2-8,3 Tage
HMGCoA-Reduktase	ER	2-3 Stunden

b

Zellkompartiment	durchschnittliche Halblebenszeit der Proteine (Tage)
Kern	5,1
Cytosol	5,1
ER	2,1
Plasmanembran	2,1
Ribosomen	5,0
Mitochondrien	4-5

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen könnte also der hohe Wert an Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in den Plasmaproteinen durch eine hohe Syntheserate der Plasmaproteine im Vergleich zu den Gewebeproteinen verursacht sein. Mehrere Beobachtungen sprechen jedoch dafür, daß dem hohen Wert von radioaktiv markiertem Tyrosinsulfat in den Plasmaproteinen in der Tat auch eine hohe Gleichgewichtskonzentration an Tyrosinsulfat entsprach:

Der Wert für Tyrosinsulfat in Plasmaproteinen lag unabhängig vom Bezugspunkt (Proteinmenge oder Gesamtsulfatinkorporation) höher als der für Gewebeproteine (Abb. C.4B und C). Zwar könnte beim Bezug auf die Proteinmenge der Tyrosinsulfatgehalt der Plasmaproteine wegen einer möglicherweise hohen Syntheserate (und folglich Sulfateinbaurate) dieser Proteine im Vergleich zu den Gewebeproteinen überschätzt werden. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da nur der Tyrosinsulfatwert, nicht aber die Gesamtsulfatinkorporation in Plasmaproteine höher war als in Gewebeproteine.

Andererseits könnten beim Bezug auf die Gesamtsulfatinkorporation der Tyrosinsulfatgehalt der Gewebeproteine unterschätzt werden, da die extrazelluläre Matrix der Gewebe viel sulfatierte Proteoglykane enthält (vgl. Müller und Heilmann, 1984). Dies scheint jedoch auch nicht zuzutreffen, da der Tyrosinsulfatgehalt der Gewebe auch dann niedriger lag als der der Plasmaproteine, wenn er auf die Proteinmenge bezogen wurde.

Die beiden Darstellungsweisen des Tyrosinsulfatgehalts (Tyrosinsulfat pro mg Protein und Tyrosinsulfat pro Gesamtsulfatinkorporation) ergänzen sich also gegenseitig und deuten darauf hin, daß der Tyrosinsulfatgehalt der Plasmaproteine absolut gesehen höher

lag als der in Gewebsproteinen.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob der hohe Wert von Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in den Plasmaproteinen durch eine hohe spezifische Radioaktivität des (^{35}S)-Sulfats am Ort der Plasmaproteinbiosynthese verursacht sein könnte. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da die Plasmaproteine höchstwahrscheinlich vor ihrer Sekretion aus der Leber und anderen Geweben am Tyrosin sulfatiert werden (s. Abb. C.5). Demnach wird bei der Sulfatierung der meisten Plasmaproteine der gleiche Pool von (^{35}S)-sulfatmarkiertem PAPS als Kosubstrat benutzt wie bei der Sulfatierung von Proteinen der Leber. D.h., die spezifische Aktivität des Kosubstrats für die Sulfatierung der meisten Plasmaproteine war die gleiche wie für die Biosynthese der Hepatocytenproteine. Trotzdem lag der Einbau von (^{35}S)-Sulfat in Tyrosin der Plasmaproteine (auf mg Protein bezogen) etwa zehnmal höher als bei den Leberzellproteinen.

Die Tyrosinsulfatierung wurde bei sehr vielen einzelnen Plasmaproteinen beobachtet (Abb. C.7). Der hohe Tyrosinsulfatgehalt der Plasmaproteine war also nicht durch ein oder wenige besonders abundante bzw. stark tyrosinsulfatierte Plasmaproteine verursacht.

Im Gegensatz zu den Plasmaproteinen waren die Gewebsproteine überwiegend an Kohlenhydraten sulfatiert (Abb. C.6, links).

C.1.3.3 Die Tyrosinsulfatierung, eine kovalente Modifikation sekretorischer Proteine?

Da die Plasmaproteine fast ausschließlich sekretorischer Natur sind, ist der hohe Wert an Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in Plasmaproteinen ein weiterer Hinweis darauf, daß die Tyrosinsulfatierung bevorzugt bei sekretorischen Proteinen auftreten könnte (vgl. Fragestellung, Abschnitt A.5). Die Anreicherung von Tyrosinsulfat in Proteinen, die von verschiedenen Geweben in das Blutplasma sezerniert werden, könnte das Ergebnis eines selektiven Vorgangs sein: z.B. könnten Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind, häufiger sulfatiert werden als andere Proteinklassen. Dies trifft sicher zu im Vergleich mit den cytosolischen Proteinen, die aufgrund der Kompartimentierung der Zelle nicht als Substrat für eine im Golgi-Apparat lokalisierte Tyrosylproteinsulfotransferase in Frage kommen. Andererseits könnte die Tyrosinsulfatierung von Proteinen deren Transport vom Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel begünstigen (s. Huttner et al., 1986).

Der Tyrosinsulfatgehalt der Gewebe war nicht durch unvollständige Perfusion und damit durch Kontamination der Gewebe mit Proteinen des Blutplasmas verursacht, denn das Muster der tyrosinsulfatierten Proteine in den Geweben unterschied sich spezifisch von dem der Plasmaproteine (Abb. C.6, Ep). Das Vorhandensein geringer, aber signifikanter Mengen tyrosinsulfatierter Proteine in den Geweben steht nicht a priori im Widerspruch zu der Hypothese, daß die Tyrosinsulfatierung eine Modifikation sekretorischer Proteine darstellen könnte. Da die Gewebsproteine eine heterogene

Mischung von Proteinen des Cytosols, verschiedener Zellkompartimente und der extrazellulären Matrix sind, könnten die in den Geweben nachgewiesenen tyrosinsulfatierten Proteine verschiedenen Kategorien angehören:

1) Sekretorische Proteine, die entweder in die extrazelluläre Matrix sezerniert worden sind, oder die Zelle noch nicht verlassen haben. Letzteres können konstitutiv sezernierte Proteine sein, die sich gerade auf dem Weg durch den Golgi-Apparat bzw. in Transportvesikeln befinden oder in sekretorischen Granula für die regulierte Sekretion gespeicherte Proteine. Beispiele solcher in Gewebshomogenaten nachweisbarer tyrosinsulfatierter Proteine sind:

Proteine der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin (Liu et al., 1985), Entactin (Paulsson et al., 1985) und Kollagen (Fessler et al., 1986, Jukkola et al., 1986); reguliert sekretorische tyrosinsulfatierte Proteine der Hypophyse (Sekretogranin II: Rosa et al., 1985 a), der Nebenniere (Sekretogranin I und II: Rosa et al., 1985 b) und der Schilddrüse (Thyreoglobulin: Herzog, 1985); ein Teil der in der Leber nachgewiesenen tyrosinsulfatierten Proteine könnte Plasmaproteine auf dem Weg zur Zelloberfläche darstellen.

Das Vorkommen der oben genannten tyrosinsulfatierten sekretorischen Proteine in Gewebshomogenaten steht nicht im Widerspruch zur Arbeitshypothese, nach der bevorzugt sekretorische Proteine tyrosinsulfatiert werden. Dasselbe gilt für eine weitere Gruppe von Proteinen, nämlich

2) Plasmaproteine, also ursprünglich sekretorische Proteine, die durch Endocytose wieder in die Zelle aufgenommen worden sind.

Ein Beispiel dafür ist α_2 -Makroglobulin, das in einigen Geweben (z.B. in Ovar, Testis und Epididymis) nachweisbar war (Pfeil 1 in Abb. C.1 und C.2). α_2 Makroglobulin wird bekanntlich von Fibroblasten endocytiiert (v. Leuven, 1982), wodurch das Vorkommen dieses Plasmaproteins in den genannten Geweben erklärt werden könnte.

3) Im Widerspruch zur Arbeitshypothese stünde die Existenz gewebsspezifischer, nicht sekretorischer Proteine.

Um die Arbeitshypothese zu verifizieren, wäre die Identifizierung weiterer tyrosinsulfatierter Proteine in den Geweben notwendig und die Untersuchung ihrer Lokalisation in verschiedenen Zelltypen oder Zellkompartimenten. Mit dem vorliegenden Versuchsansatz waren diese Untersuchungen nicht möglich, da der Gesamtorganismus zu komplex ist und die (^{35}S)-Sulfatinkorporation in einzelne Proteine zu gering war. Daher wurde im Folgenden die Kompartimentierung tyrosinsulfatierter Proteine in einfacheren Systemen, d.h. in Zellkulturen untersucht.

C.2 Charakterisierung der Sekretogranine aus Ratten- Phäochromocytom-(PC12)-Zellen - ein Modellbeispiel für tyrosinsulfatierte, sekretorische Proteine

C.2.1 Fragestellung

Lee und Huttner (1983) hatten in PC12-Zellen zwei Paare jeweils homologer tyrosinsulfatierter Proteine mit Molekulargewichten von 113- und 105 kD bzw. 86- und 84 kD beschrieben. Aufgrund ihres Vorkommens in sekretorischen Granula einer Reihe endokrin sezernierender Gewebe (s. Abschnitt C.2.2.6) wurden diese Proteine später Sekretogranin I (113-, 105 kD) und Sekretogranin II (86-, 84 kD) genannt. Die Sekretogranine stellen die auffälligsten sulfatierten Banden im Homogenat von PC12-Zellen dar (Abschnitt C.2.2.1 und Lee und Huttner, 1983).

Die Sekretogranine wurden aus Zellkulturen gereinigt, um polyklonale Antikörper zu gewinnen, und um die Proteine biochemisch und zellbiologisch zu charakterisieren (Abschnitt C.2.2.2 und C.2.2.3).

Um festzustellen, ob die Sekretogranine wie die übrigen bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine sezerniert werden (s. Abschnitt A.4.3), untersuchte ich die depolarisations-stimulierte Sekretion aus PC12-Zellen (Abschnitt C.2.2.4).

Die physiologische Funktion der Sekretogranine ist bisher nicht bekannt. Die Identifizierung ihrer Funktion ist jedoch - neben der biochemischen und cytochemischen Charakterisierung - wichtig, um die Bedeutung der Tyrosinsulfatierung bei diesen Proteinen zu klären. Erste Anhaltspunkte für eine hypothetische Funktion der Sekretogranine ergaben sich aus der Beobachtung, daß

Sekretogranin II aus PC12-Zellen identisch ist mit einem unabhängig beschriebenen, sulfatierten, sekretorischen Protein, das in der Adenohypophyse und im Nebennierenmark des Rinds vorkommt (Rosa und Zanini, 1981 und 1983). Da beide Gewebe endokrin sekretorische Zellen enthalten, die - unter anderem - Peptidhormone auf dem regulierten Weg sezernieren (O'Connor, 1983), stellte sich die Frage, ob die Sekretogranine außer in Hypophyse, Nebennierenmark und Schilddrüse noch in anderen sekretorischen Geweben vorkommen und ob eine Korrelation besteht zwischen dem Vorhandensein von Sekretograninen in bestimmten Geweben und der Eigenschaft dieser Gewebe, Peptidhormone zu sezernieren. Eine solche Korrelation war von mehreren Autoren für ein weiteres sekretorisches Protein, das Chromogranin A, beobachtet worden: Chromogranin A, das ursprünglich als Hauptprotein der sekretorischen Granula (chromaffinen Granula) des Nebennierenmarks beschrieben worden war (Übersicht s. Winkler und Westhead, 1980), ist in vielen endokrin-sekretorischen Geweben nachweisbar, unter anderem auch in Hypophyse und Schilddrüse (Lloyd und Wilson, 1983; O'Connor et al., 1983; Cohn et al., 1984; Somogyi et al., 1984). Da mit immunbiochemischen Methoden eine ähnlich weite Verbreitung der Sekretogranine in endokrin sezernierenden Geweben der Ratte gezeigt werden konnte (Abschnitt C.2.2.6), wurde bei der vergleichenden biochemischen Charakterisierung der Sekretogranine gleichzeitig eine mögliche Verwandtschaftsbeziehung zwischen Sekretograninen und Chromogranin A untersucht (s. Abschnitt C.2.2.5). Einige Hypothesen für die Funktion der Sekretogranine und von Chromogranin A werden in Abschnitt C.2.3.5.3 diskutiert.

C.2.2 Ergebnisse

C.2.2.1 Sekretogranin I und II, zwei abundante tyrosin-sulfatierte Proteine in PC12-Zellen

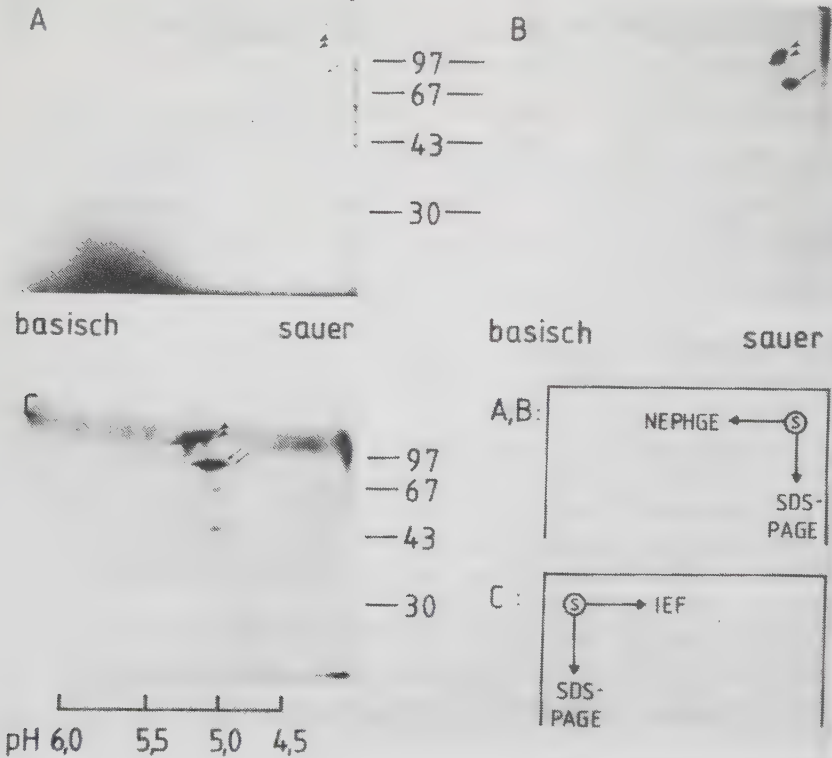
Zur Identifizierung der Sekretogranine wurden PC12-Zellen mit (^{35}S)-Sulfat markiert und die Proteine des gesamten Zellhomogenats durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die erste Dimension wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: "NEPHGE" und isoelektrische Fokussierung. Die "NEPHGE"-Elektrophorese, bei der die Proteine in einem breiten pH-Gradienten getrennt werden, ohne den Gleichgewichtszustand (isoelektrische Fokussierung) zu erreichen, wurde deshalb verwendet, da sie die meisten Zellproteine erfaßt, während bei der isoelektrischen Fokussierung extrem saure oder basische Proteine aus dem Gel herauslaufen. Nach Coomassie Blau-Färbung im NEPHGE-Gel gehörten die Sekretogranine neben etwa 30 anderen Proteinen zu den Hauptproteinbanden (Abb. C.10A). Sie stellen also relativ abundante Proteine dar. Das Autoradiogramm zeigt, daß Sulfat fast ausschließlich in die Sekretogranine und in Proteoglykane eingebaut wurde (Abb. C.10B). Letztere wanderten in der ersten Dimension nicht in das Gel und zeigten sich als kontinuierliche Schwärzung am oberen rechten Rand des Gels.

Durch isoelektrische Fokussierung (Abb. C.10C) wurden die isoelektrischen Punkte der Sekretogranine ermittelt: pH 5,2 für Sekretogranin I, pH 5,0 für Sekretogranin II.

Daß die Sekretogranine auch in Nebennierenmarkszellen, dem nicht transformierten Stammgewebe der PC12-Zellen tyrosinsulfatiert

Abb. C.10: Zweidimensionale Gelelektrophorese sulfatmarkierter PC12-Zellproteine.

PC12-Zellen wurden 18 Stunden mit (^{35}S)-Sulfat markiert. Je 100 μg Zellprotein wurden zweidimensional elektrophoretisch aufgetrennt (Methoden B.5.2.2). (A, B): erste Dimension NEPHGE, zweite Dimension PAGE; (C): erste Dimension IEF, zweite Dimension PAGE. (A): Proteinfärbung mit Coomassie Blau; (B, C): Autoradiogramm. Pfeilspitzen: Sekretogranin I, Pfeile: Sekretogranin II. Die Schemata rechts unten erläutern die Laufrichtung der Elektrophorese. (S) = Startpunkt der Proteinprobe in der ersten Dimension. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind in der Mitte angegeben.

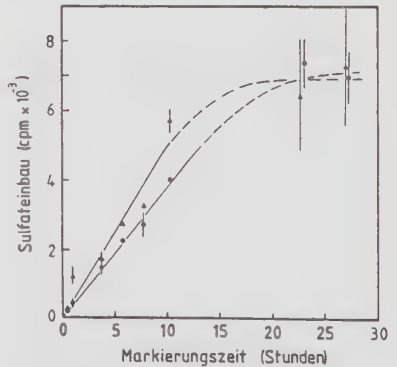


sind, zeigte die in vivo-Markierung von Nebennierenmarkszellen (in Zusammenarbeit mit Dr. P. Rosa durchgeführt, s. Rosa et al., 1985b).

Um den Zeitverlauf des Sulfateinbaus in die Sekretogranine in vivo zu verfolgen, wurden gleiche Aliquots konfluenter PC12-Zellen bis zu 27,5 Stunden lang mit (^{35}S)-Sulfat markiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Sekretogranine wurden im Gel durch Fluorographie detektiert und durch Szintillationszählung quantifiziert. Abb. C.11 zeigt, daß die Synthese sulfatmarkierter Sekretogranine mindestens 10 Stunden lang linear zunahm. Nach ca. 20 Stunden war kein signifikanter Anstieg des Sulfateinbaus mehr zu verzeichnen. Dieser Zeitverlauf deutet auf einen großen Pool intrazellulär akkumulierter Sekretogranine hin, deren Markierung nur langsam einen Gleichgewichtszustand erreicht.

Abb C.11: Zeitverlauf des Sulfateinbaus in die Sekretogranine bei der in vivo-Markierung von PC12-Zellen.

Ca. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden 0,5 bis 27,5 Stunden lang mit (^{35}S)-Sulfat markiert (s. Methoden B.3.3). Das Zellhomogenat wurde durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert und die Sekretogranine durch Szintillationszählung quantifiziert. Aufgetragen sind die Mittelwerte von Duplikaten eines repräsentativen Versuchs. Die Länge der Balken zeigt die Lage der Einzelwerte. (▲): Sekretogranin I, (●): Sekretogranin II.



C.2.2.2 Ergebnisse der Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen

Da zur Quantifizierung der Sekretogranine während der Anreicherung kein funktioneller Test - etwa die Messung einer Enzymaktivität - existiert, wurden PC12-Zellen in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert und das Zellhomogenat bzw. die angereicherten Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Die Sekretogranine wurden durch Fluorographie lokalisiert und durch Szintillationszählung quantifiziert. Sofern nicht anders vermerkt, wurde die gesamte Aufarbeitung bei 4°C durchgeführt.

C.2.2.2.1 Homogenisation

(^{35}S)-sulfatmarkierte PC12-Zellen wurden hypoton lysiert (s. Methoden B.6.1). Nach Ultrazentrifugation des Homogenats befanden sich 60-80% der Sekretogranine löslich im hypotonen Überstand (Ü1) (s. Tabelle C.5, Seite 89).

C.2.2.2.2 Hitzeschritt

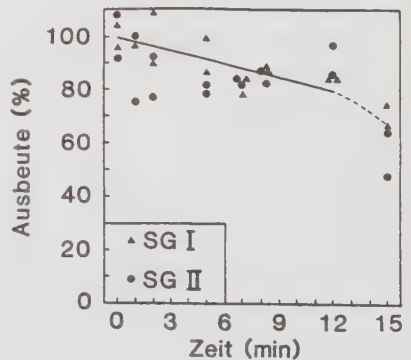
Vorversuche von Dr. R. Lee in unserem Labor hatten gezeigt, daß die Sekretogranine beim Erhitzen des hypotonen Überstands (Ü1, s.o.) auf 100°C in Lösung bleiben, während der größte Teil der übrigen Proteine präzipitiert und durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Die folgenden Experimente zeigen den Einfluß der Dauer der Hitzebehandlung und der Ionenstärke des Puffers auf die Stabilität der Sekretogranine sowie auf den Anreicherungseffekt des Hitzeschritts.

1) Stabilität der Sekretogranine bei Hitzebehandlung

Um die Stabilität der Tyrosinsulfatesterbindung sowie potentiell stattfindende proteolytische Degradation bei der Hitzebehandlung zu untersuchen, wurde sulfatmarkierter hypotoner Überstand (Ü1) bis zu 15 min lang bei 100°C inkubiert. Aliquots der resultierenden Suspension wurden für die Quantifizierung der Sekretogranine verwendet. Abb. C.12 zeigt die Ausbeute sulfatmarkierter Sekretogranine in Abhängigkeit von der Dauer der Hitzebehandlung. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle fand nur geringfügige Degradation statt. Nach fünfminütiger Hitzebehandlung konnten rund 90% der eingesetzten Sekretogranine ohne apparente Veränderung des Molekulargewichts wiedergefunden werden. Daher wurde bei der präparativen Proteinreinigung die Hitzebehandlung 5 Minuten lang durchgeführt.

Abb. C.12: Hitzebehandlung der Sekretogranine, 1: Stabilität der Proteine.

PC12-Zellen wurden 18 Stunden mit (³⁵S)-Sulfat markiert und ein hypotoner Überstand hergestellt (Ü1, s. Methoden B.6.1). Der hypotone Überstand wurde bis zu 15 Minuten lang bei 100°C inkubiert (s. Methoden B.6.2). Aliquots der resultierenden Proteinsuspension wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert und die Sekretogranine durch Szintillationszählung quantifiziert. Die Ausgangsmenge der sulfatmarkierten Sekretogranine wurde jeweils auf 100% normiert.



2) Löslichkeit der Sekretogranine nach Hitzebehandlung

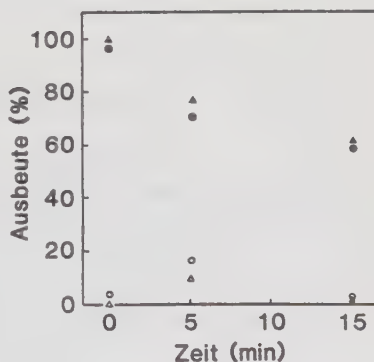
Sulfatmarkierter hypotoner Überstand (Ü1) wurde 5- bzw. 15 min auf 100°C erhitzt, die präzipitierten Proteine durch

Ultrazentrifugation sedimentiert und die Verteilung der Sekretogranine auf den resultierenden Überstand (Ü2 = hitzestabiler Überstand) und das Präzipitat quantifiziert. Abb. C.13 zeigt, daß die nach der Hitzebehandlung detektierbaren Sekretogranine zu 80- bis 95% löslich waren. Nach Rezentrifugation eines unbehandelten Kontrollüberstands (Ü1) blieben 95-100% der Sekretogranine löslich im Überstand 2.

Abb. C.13: Hitzebehandlung der Sekretogranine, 2:

Löslichkeit der Proteine nach dem Hitzeschritt.

Der sulfatmarkierte hypotone Überstand von PC12-Zellen (Ü1, s. Methoden B.6.1) wurde bei 100°C inkubiert und durch die Hitzebehandlung präzipitierte Proteine abzentrifugiert (s. Methoden B.6.2). Der lösliche, hitzestabile Überstand (geschlossene Symbole) sowie das Präzipitat (offene Symbole) wurden durch SDS-PAGE analysiert und die Sekretogranine durch Szintillationszählung quantifiziert. Die Ausgangsmenge der sulfatmarkierten Sekretogranine wurde jeweils auf 100% normiert. (▲,△): Sekretogranin I, (●,○): Sekretogranin II.



3) Einfluß der Ionenstärke auf den Reinigungseffekt der Hitzebehandlung

Die Pufferzusammensetzung bei der Hitzebehandlung beeinflusste das Ausmaß der Präzipitation kontaminierender Proteine. Zusatz von Saccharose (0,16- bzw. 0,32 M) oder TritonX-100 (1%) erhöhte die Löslichkeit von Kontaminanten (Ergebnis nicht gezeigt). Dagegen führte eine Erhöhung der Ionenstärke durch Zusatz von Natriumchlorid (0,1 - 0,5 M) oder EDTA (20- bzw. 50 mM) zu

vermehrter Präzipitation kontaminierender Proteine. Abb. C.14 zeigt den Reinigungseffekt des Hitzeschritts in Gegenwart von Natriumchlorid: Nach 5 Minuten Hitzebehandlung mit oder ohne Natriumchlorid wurden gleiche Aliquots der hitzestabilen Überstände (Ü2) sowie der Präzipitate (N2) durch SDS-PAGE analysiert und die Proteine im Gel durch Silber angefärbt. Als Kontrolle diente ein Aliquot des hypotonen Überstands (Ü1), der nicht erhitzt wurde (Spur 1). Nach Erhitzen eines entsprechenden Aliquots von Ü1 (ohne Zugabe von Natriumchlorid) nahm die Proteinmenge im hitzestabilen Überstand (Ü2) bereits drastisch ab (Spur 2). Durch Zusatz von 0,1 M bzw. 0,5 M Natriumchlorid wurde der Reinigungseffekt der Hitzebehandlung noch weiter verstärkt (Spur 3 und 4). Die Proteinfärbung des hitzestabilen Überstands zeigte in diesem Fall die Sekretogranine als distinkte Banden (s. Pfeile in Abb. C.14), die kontaminierenden Proteine waren größtenteils niedermolekular und durch die analytische eindimensionale Gelelektrophorese gut von den Sekretograninen abgetrennt.

Die Ausbeute der Sekretogranine im hitzestabilen Überstand wurde im gleichen Experiment durch Szintillationszählung quantifiziert und ist in Tabelle C.4 dargestellt. Bei steigenden Natriumchloridkonzentrationen nahm die Ausbeute der Sekretogranine im hitzestabilen Überstand nur geringfügig ab. Mit 80-85% war die Ausbeute hoch genug für eine Anwendung des Hitzeschritts zur präparativen Proteinreinigung.

Abb. C.14: Hitzebehandlung der Sekretogranine, 3: Einfluß von Natriumchlorid auf den Anreicherungs-effekt.

Der hypotone Überstand (U1, s. Methoden B.6.1) von sulfatmarkierten PC12-Zellen wurde in Gegenwart von 0,1 bzw. 0,5 M NaCl 5 Minuten lang auf 100°C erhitzt und die präzipitierten Proteine abzentrifugiert (s. Methoden B.6.2). Die Proteine des hitzestabilen Überstands (U2) (Spur 2-4) und des Präzipitata (N2) (Spur 5) und zum Vergleich der unbehandelte hypotone Überstand (Spur 1) wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Die Pfeilspitzen (Pfeile) zeigen die Position von Sekretogranin I (II).

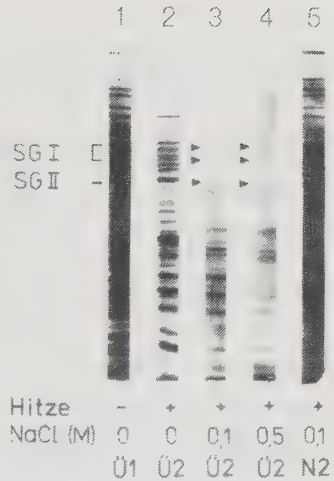


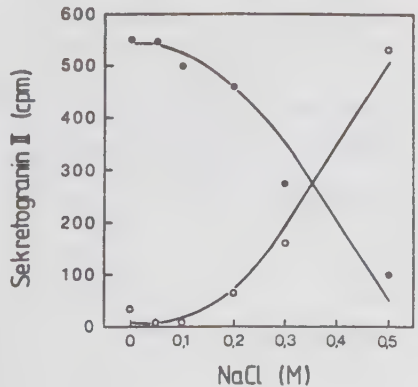
Tabelle C.4: Hitzestabilität der Sekretogranine in Gegenwart von Natriumchlorid.

Durchführung der Hitzebehandlung s. Legende zu Abb. C.14. Die Sekretogranine im hitzestabilen Überstand wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert und durch Scintillationszählung quantifiziert. Die Ausgangsmenge der Sekretogranine wurde jeweils auf 100% normiert.

NaCl-Konzentration (M)	Sulfatmarkierte Sekretogranine im hitzestabilen Überstand (U ₂) (%)	
	Sekretogranin I	Sekretogranin II
0	92	91
0,1	89	81
0,3	88	86
0,5	82	75

Abb. C.15: Bindung von Sekretogranin II an DEAE-Sephacel.

Aliquots des hitzestabilen Überstands (U₂, s. Methoden B.6.2) von sulfatmarkierten PC12-Zellen wurden bei unterschiedlichen Natriumchloridkonzentrationen mit DEAE-Sephacel inkubiert (s. Methoden B.6.3.2). Die an den Amionenaustauscher gebundenen bzw. in Lösung bleibenden Proteine wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert und Sekretogranin II durch Scintillationszählung quantifiziert. (●): an DEAE-Sephacel gebunden, (O): nicht gebunden.



C.2.2.2.3 Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel

Die Sekretogranine sind saure Proteine, deren isoelektrische Punkte zwischen pH 5 und 5,5 liegen (Lee und Huttner, 1983 und Abb. C.10C). Daher wurde als nächster Reinigungsschritt die Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel gewählt.

Die Bindung von Proteinen an einen Ionenaustauscher wird vom pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung beeinflusst. Um Bedingungen zu ermitteln, bei denen die Sekretogranine als Anionen an DEAE-Sephacel binden und gleichzeitig die Bindung kontaminierender Proteine so gering wie möglich gehalten wird, wurde ein niedriger pH-Wert gewählt: pH 6,0, also etwa eine pH-Einheit über dem isoelektrischen Punkt der Sekretogranine. Bei konstantem pH-Wert wurde die Natriumchloridkonzentration variiert, um festzustellen, bis zu welcher Ionenstärke die Sekretogranine an DEAE-Sephacel binden.

Dazu wurden Aliquots von DEAE-Sephacel in der Chloridform in Gegenwart von 0- bis 0,5 M Natriumchlorid mit sulfatmarkiertem hitzestabilem Überstand (Ü2) inkubiert. An den Ionenaustauscher gebundene Proteine wurden mit SDS eluiert. In der gebundenen und nicht gebundenen Proteinfraction wurde die Menge an Sekretogranin II quantifiziert (Abb. C.15). Bei 0,1 M NaCl waren mehr als 95% des Sekretogranin II an den Ionenaustauscher gebunden. Erhöhung der Ionenstärke bewirkte einen Rückgang des gebundenen Anteils, der bei 0,35 M NaCl noch etwa die Hälfte betrug.

Um festzustellen, ob die Bindung der Sekretogranine an DEAE-Sephacel auch bei einem niedrigeren, näher an ihrem isoelektrischen Punkt liegenden pH-Wert möglich ist, und ob damit die Bindung von Kontaminanten noch weiter verringert werden kann, wurde bei niedriger Ionenstärke der pH-Wert des Testansatzes von pH 5,0 bis 6,0 variiert. Der Puffer war 20 mM MES, 50 mM NaCl, 5 mM β -Merkaptoäthanol und wurde mit Natronlauge auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Die Sekretogranine wurden im gesamten getesteten pH-Bereich an DEAE-Sephacel gebunden. SDS-PAGE und Proteinfärbung im Gel zeigten keine signifikante Veränderung des Musters der bei pH 5,0 gebundenen Proteine im Vergleich zu pH 6,0 (nicht gezeigt).

Daraus ergaben sich folgende Bedingungen für die präparative Durchführung der Anionenaustauschchromatographie: Die Beladung der DEAE-Säule erfolgte bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,1 M und pH 6,0. Eluiert wurde bei konstantem pH-Wert mit einem linearen Natriumchloridgradienten von 0,2 bis 0,4 M.

C.2.2.2.4 Präparative Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen

Die Sekretogranine wurden aus PC12-Zellen durch hypotone Lyse, Ultrazentrifugation, Hitzeschritt und DEAE-Chromatographie angereichert wie in Abb. C.16 schematisch dargestellt. Das Ergebnis der Aufarbeitung zeigen Tabelle C.5 und Abb. C.17.

Der effektivste Reinigungsschritt bezüglich kontaminierender Proteine war in Übereinstimmung mit den Vorversuchen die

Abb. C.16: Flußdiagramm der präparativen Reinigung der Sekretogranine.

Details der Methode s. Text, Abschnitt C.2.2.2.4 und B.6. Bis auf die Hitzebehandlung wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

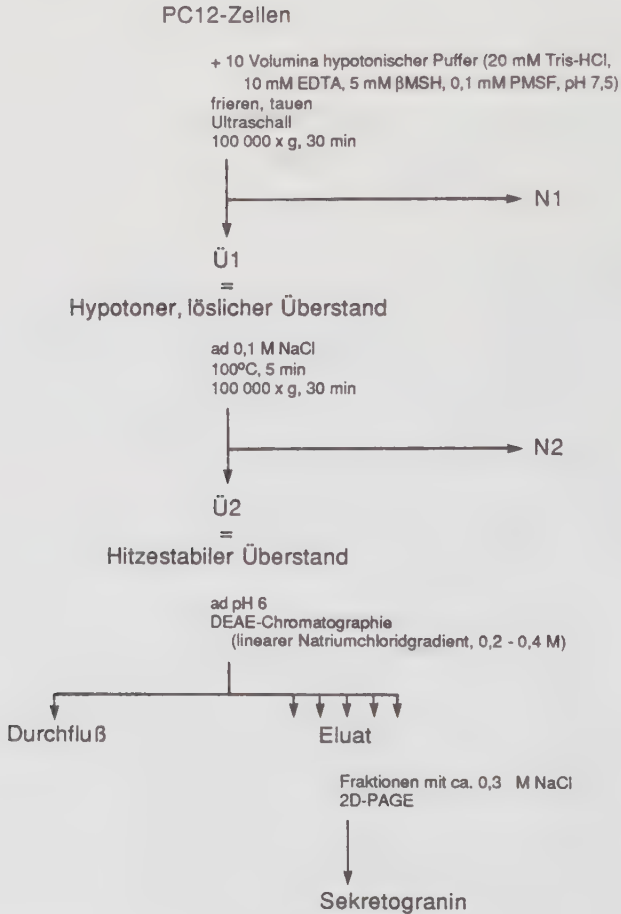


Abb. C.17: Anreicherung der Sekretogranine aus PC12-Zellen.

Die Sekretogranine wurden entsprechend dem Schema in Abb. C.16 aus sulfatmarkierten PC12-Zellen angereichert. Jeweils gleiche Volumenanteile von Homogenat (1) und angereicherten Fraktionen (2-5) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine durch Coomassie Blau gefärbt (C) und sulfatmarkierte Proteine durch Autoradiographie (S) nachgewiesen. (1): Homogenat; (2): hypotoner Überstand, U1; (3): hitzestabiler Überstand, U2; (4): Präzipitat des Hitzeschritts, N2; (5): DEAE-Eluat (ca. 0,3 M NaCl, Fraktionen 17 bis 24 in Abb. C.18). Die Molekulargewichte der Standardproteine (Dalton) sind links angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Position von Sekretogranin I und II.

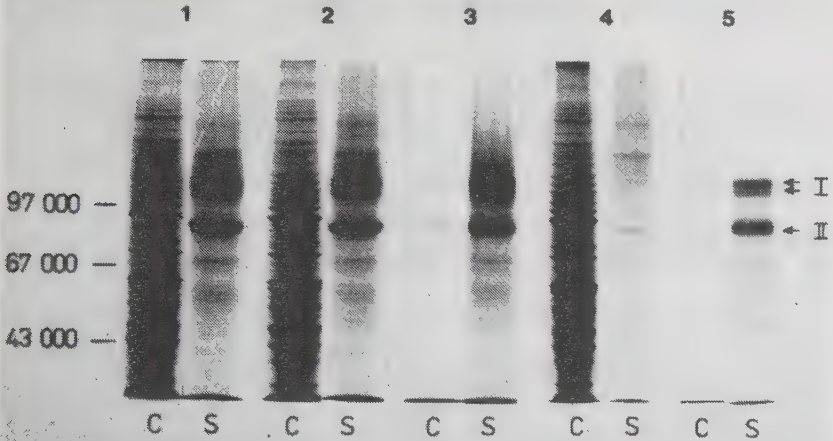


Tabelle C.5: Anreicherungstabelle der Sekretograninreinigung.

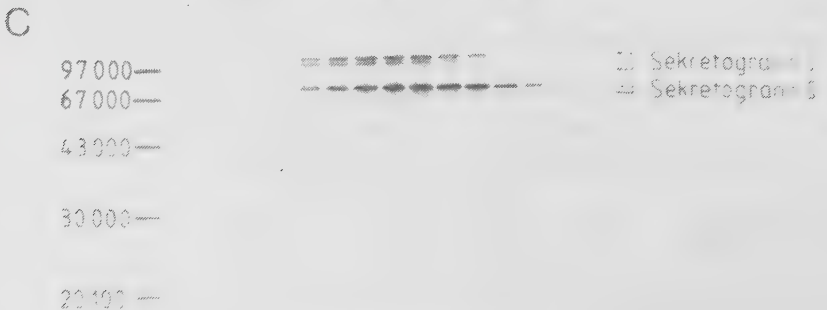
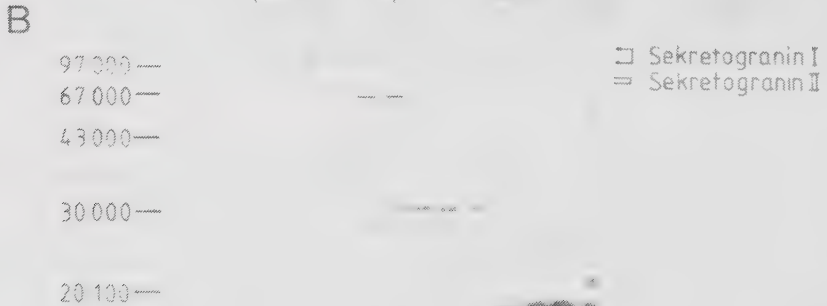
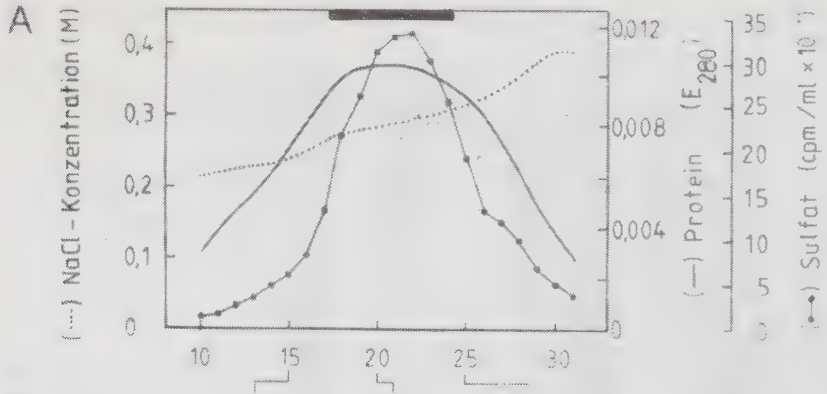
Die Sekretogranine wurden aus (^{35}S)-sulfatmarkierten PC12-Zellen angereichert wie in Abb. C.16 beschrieben. Homogenat und angereicherte Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert (vgl. Abb. C.17) und die Sulfatradioaktivität der Sekretogranine quantifiziert. Die Sulfatradioaktivität der Sekretogranine im Homogenat wurde jeweils auf 100% normiert. Die Anreicherungsfaktoren sind auf die Proteinmenge (nach Lowry) in der jeweiligen Fraktion bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten.

Fraktion	Ausbeute (%)		Anreicherungsfaktor	
	SGI	SGII	SGI	SGII
Homogenat	100	100	1	1
U1 = hypotoner Überstand	62 ± 26	80 ± 30	1 ± 0,3	1,4 ± 0,4
U2 = hitzestabiler Überstand	60 ± 27	75,5 ± 27	9,5 ± 2	12,5 ± 4
DEAE-Eluat (0,3 M NaCl ^(*))	22 ± 9	41,5 ± 20	19 ± 8	38 ± 12

(^{*}): Fraktionen 17 bis 24 in Abb. C.18

Abb. C.18: Anionenaustauschchromatographie zur Anreicherung der Sekretogranine.

Hitzestabiler Überstand (U2) von sulfatmarkierten PC12-Zellen (s. Methoden B.6.2) wurde an DEAE-Sephacel, das mit 0,1 M NaCl in Puffer B äquilibriert war, gebunden. Die Säule wurde mit 0,2 M NaCl in Puffer B gewaschen und mit einem linearen Natriumchloridgradienten in Puffer B eluiert (Methoden B.6.3.3). (A) Verlauf des Natriumchloridgradienten und Elutionsprofil des UV-adsorbierenden Materials sowie der Sulfatradioaktivität. (B,C) SDS-PAGE gleicher Volumenanteile der sekretograninhaltigen Fraktionen 12 bis 27; Proteinfärbung mit Coomassie Blau (B), Autoradiogramm (C). Die sekretograninhaltigen Fraktionen 17 bis 24 (waagrechte Balken in A und C) wurden für die zweidimensionale präparative SDS-PAGE vereinigt (vgl. Abb. C.19). Die Molekulargewichte der Standardproteine (in Dalton) sind links angegeben.



Hitzebehandlung (Abb. C.17, vgl. Spur 2C und 3C). Bei der Ionenaustauschchromatographie wurden die Sekretogranine mit 0,25 M bis 0,35 M Natriumchlorid von der DEAE-Säule eluiert. Dabei war eine Auftrennung der mikroheterogenen Varianten zu beobachten (Abb. C.18): bei 0,25 M Natriumchlorid wurden zunächst die weniger sauren Varianten eluiert, die ein geringfügig niedrigeres Molekulargewicht besitzen als die mehr sauren Varianten. Bei ansteigenden Ionenstärken wurden zunehmend saure Varianten mit höherem Molekulargewicht eluiert (vgl. dazu die breiten, in der Diagonalrichtung des Gels ausgezogenen Banden nach zweidimensionaler Gelelektrophorese, Abb. C.19). Es wurden etwa 35- bis 50% der eingesetzten Sekretogranine eluiert. Da im Durchfluß der DEAE-Säule keine Sekretogranine nachweisbar waren, war die geringe Ausbeute der Chromatographie vermutlich durch Proteindegradation oder durch irreversible Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial verursacht.

Die Bedeutung der Anionenaustauschchromatographie, die auf den Proteingehalt bezogen einen verhältnismäßig geringen Anreicherungsfaktor lieferte (Tabelle C.5), lag in der Abtrennung der sulfatierten Proteoglykane, die in der SDS-PAGE vor allem mit Sekretogranin I überlappen (Abb. C.17, vgl. Spur 3,S und Spur 5,S).

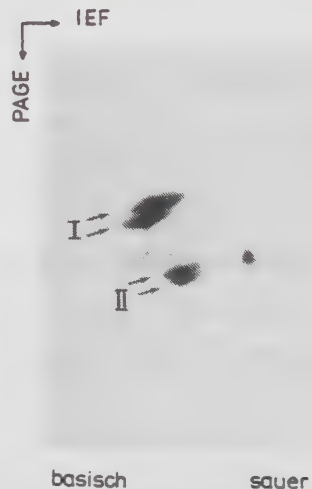
Daß die Ausbeute der (^{35}S)-Radioaktivität für Sekretogranin I geringer war als für Sekretogranin II liegt daran, daß sulfatierte Proteoglykane, die bei der SDS-PAGE mit Sekretogranin I überlappen und dadurch zu einer Überschätzung der Menge von Sekretogranin I führen, bei der Anreicherung entfernt

wurden.

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese (isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE) ließen sich die Sekretogranine als reine Proteinbanden darstellen (Abb. C.19). Dabei wurden aus 180 mg Zellprotein je 0,5 mg Sekretogranin I und II gereinigt (Dieser Wert wurde wie folgt abgeschätzt: Eine durch DEAE-Chromatographie angereicherte Proteinprobe, deren Proteingehalt mit der Methode nach Lowry bestimmt worden war, wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Intensität der Coomassie Blau-Färbung aller im Gel detektierten Proteinbanden verglichen. Aus der relativen Intensität der Färbung der Sekretogranine wurde ihr Anteil an der Gesamtproteinmenge abgeschätzt. Dieser Wert ist ein Näherungswert, da einzelne Proteine unterschiedliche Mengen von Coomassie Blau binden.). Berücksichtigt man die Ausbeute der sulfatmarkierten Sekretogranine von 20- bzw. 30%, so bedeutet dies, daß die Sekretogranine etwa 0,5- bis 1% des Zellproteins stellen.

Abb. C.19: Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese der angereicherten Sekretogranine.

Sekretogranine wurden aus PC12-Zellen durch Hitzebehandlung und DEAE-Chromatographie angereichert (vgl. Abb. C.16 und C.17). 165 µg Protein der DEAE-Fractionen (ca. 0,3 M NaCl, Fractionen 17 bis 24 in Abb. C.18) wurden durch Acetonpräzipitation konzentriert und durch zweidimensionale PAGE aufgetrennt (erste Dimension: IEF, zweite Dimension: SDS-PAGE). Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt. Die Pfeile bezeichnen die Position der Sekretogranine I (1) und II (2).



C.2.2.3 Antiseren gegen Sekretogranine aus PC12-Zellen

C.2.2.3.1 Spezifität der Anti-Sekretogranin-Antiseren

Für die Gewinnung polyklonaler Antiseren wurden durch 2D-PAGE zur Homogenität gereinigte Sekretogranine eingesetzt (s. Abb C.19). Das Injektionsprotokoll für die Gewinnung der Antiseren ist in Tabelle C.6 zusammengefaßt. Je zwei Kaninchen wurde Sekretogranin I oder II injiziert. Davon lieferten drei Kaninchen brauchbare anti-Sekretogranin-Antiseren. Das vierte Kaninchen zeigte erst nach der vierten Boosterinjektion eine sehr schwache Immunantwort gegen Sekretogranin II.

Die Spezifität der Antiseren wurde zunächst durch eindimensionale Immunoblot-Technik untersucht. Dafür wurden die Proteine von PC12-Zellen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose transferiert, um bei der anschließenden Antikörperbindung die Diffusion der Reagenzien zu erleichtern, d.h. die Inkubationszeiten zu verkürzen. Die gebundenen Antikörper wurden mit radioiodiertem Protein A, das an den F_c -Teil von IgG bindet, nachgewiesen (Ivarie und Jones, 1979).

Im PC12-Zellhomogenat erkannten die Antiseren 1 und 2 spezifisch Sekretogranin I bzw. Sekretogranin II (Abb. C.20, Spur 1 und 2). Dagegen reagierte Antiserum 3, das von einem mit Sekretogranin I injizierten Kaninchen stammte, sowohl mit Sekretogranin I als auch mit Sekretogranin II (Abb. C.20, Spur 3). Die vor der ersten Injektion gewonnenen Präimmunseren zeigten im Immunoblot kein Signal (Abb. C.20, Spur 4).

Es stellte sich die Frage, ob das für die Kreuzreaktion von

Abb. C.20: Spezifität der Anti-Sekretogranin-Antisera: Immunoblot-Analyse.

PC12-Zellhomogenat (50 µg Protein) wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die gebundenen Antikörper (Inkubation 4 h, RT, Verdünnung 1:100) wurden durch radiojodiertes Protein A (2,5 h Inkubation) nachgewiesen (s. Methoden B.7.3). Abgebildet sind die Fluorogramme nach Inkubation mit den Antisera 1, 2 und 3 (Spur 1-3) (vgl. Tabelle C.6) sowie Präimmunserum (Spur 4).

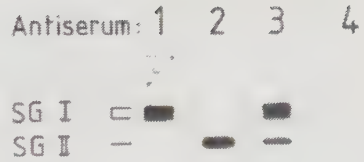


Tabelle C.6: Gewinnung Polyklonaler Antisera gegen Rattensekretogranine.

Die Sekretogranine wurden entsprechend dem Schema in Abb. C.16 aus PC12-Zellen angereichert. Die sekretograninhaltigen Banden wurden aus dem präparativen zweidimensionalen Gel ausgeschnitten (vgl. Pfeile in Abb. C.19), die Gelstücke homogenisiert und injiziert wie unter Methoden (B.7.1) beschrieben.

Antiserum Nr.	1	2	3
Antigen	SG I	SG II	SG I
Proteinfärbung	KCl	KCl	Coomassie Blau
Adjuvans	1. Injektion: komplettes Freundsches Adjuvans 2. Injektion: inkomplettes Freundsches Adjuvans		(Acrylamid)
Kaninchen	Bastarde (Züchtung MPI für Biochemie, Martinsried)		weißes Neusee- länder
Injektions- protokoll	Tag 1: 100µg 14: 50µg 33: 50µg 59: 50µg 81: 40µg	Tag1: 60µg 14: 30µg 33: 30µg 59: 30µg 81: 25µg	Tag 1: 150µg 16: 50µg 42: 50µg
Reaktion im Immunoblot mit	SG I	SG II	SG I und II

Antiserum 3 verantwortliche Epitop die in beiden Sekretograninen vorhandene Tyrosinsulfatgruppe sein könnte. Ein gegen Tyrosinsulfat gerichteter Antikörper wäre ein nützliches Werkzeug für die Untersuchungen tyrosinsulfatierter Proteine (Bäuerle, 1983). Deshalb wurde überprüft, ob die Immunpräzipitation der Sekretogranine mit Antiserum 3 durch die freie Aminosäure Tyrosinsulfat inhibiert wird, und zwar unter Bedingungen, unter denen Tyrosinsulfat und Sekretogranine um die Bindung an eine limitierende Menge von Antikörpern konkurrierten.

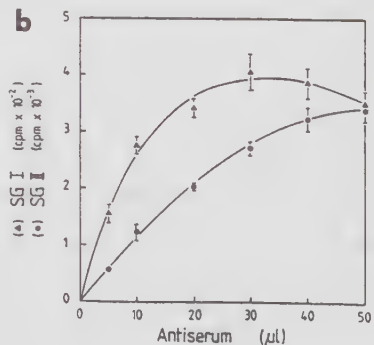
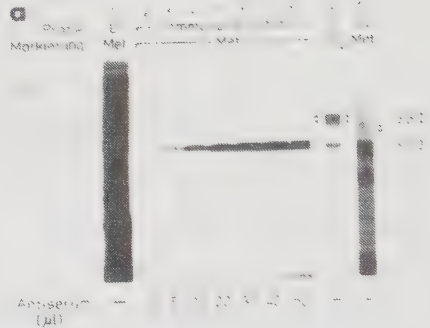
Dazu mußte zunächst ermittelt werden, wieviel Antiserum nötig ist, um eine definierte Menge von Sekretograninen zu präzipitieren (Abb. C.21). Gleiche Aliquots eines Triton-Extrakts von methioninmarkierten PC12-Zellen wurden mit steigenden Mengen Antiserum 3 inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden an Staphylococcus aureus-Bakterien, deren Zellwand Protein A enthält, adsorbiert und die Sekretogranine nach Analyse durch SDS-PAGE quantifiziert. Bei Einsatz von 10 µg Protein (Tritonextrakt) wurde mit 30-50 µl Antiserum ein Plateau der Präzipitationskurve erreicht (Abb. C.21B). Bei diesem Verhältnis Antigen zu Antiserum enthielt das Immunpräzipitat die gleiche Menge methioninmarkierter Sekretogranine wie ein aus dem Tritonextrakt hergestellter hitzestabiler Überstand (nicht

Abb. C.21: Immunpräzipitation der Sekretogranine aus (^{35}S)-methioninmarkiertem PC12-Zell-Lysat.

In einem Gesamtvolumen von 105 μl wurden 10 μg PC12-Zellproteine (55 μl Triton-extrakt, s. Methoden B.7.5.3) mit 10 bis 50 μl Antiserum 3 inkubiert. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge von Präimmuns-erum wurde die Serumproteinkonzentration im Testansatz konstant gehalten. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Bindung an Staphylococcus aureus-Suspension isoliert (Inkubation 15 min) (Methoden B.7.5.2) und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

(a): Spur (1), Fluorogramm des mit (^{35}S)-Methionin (Met) markierten Tritonextrakts (E) als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation, Exposition 1 Tag; Spuren (2-8), Immunpräzipitate mit steigenden Mengen Antiserum (3 Tage Exposition); zum Vergleich wurden Tritonextrakt aus (^{35}S)-sulfatmarkierten PC12-Zellen Spur (9) und hitzestabiler Überstand (U2) von (^{35}S)-methionin-markierten PC12-Zellen analysiert (Spur 10) (separater Elektrophoreselauf). Die Position von Sekretogranin I (Pfeilspitzen) und Sekretogranin II (Pfeile) sind rechts angegeben.

(b): Die Sekretogranine I ($\blacktriangle$) und II ($\bullet$) aus den Immunpräzipitaten (vgl. Spur 2-8 in a) wurden ausgeschnitten und durch Scintillationszählung quantifiziert. Die Balken geben die Fehlergrenzen von zwei unabhängig durchgeführten Präzipitationen an.



gezeigt), d.h., die Sekretogranine wurden quantitativ präzipitiert (*).

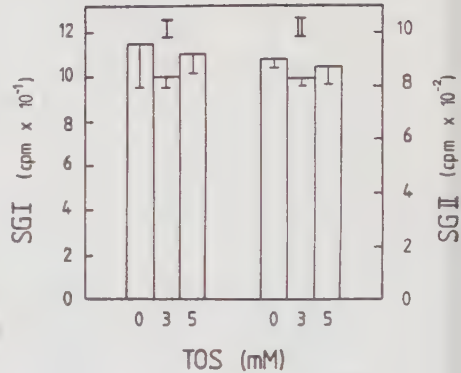
Für die Immunpräzipitation in Gegenwart von Tyrosinsulfat wurden 50 µl Tritonextrakt (10 µg Protein) mit 20 µl Antiserum inkubiert. Die Menge des Antiserums lag somit knapp unter dem Plateau der Antiserumbindungskurve, also im Bereich limitierender Antikörperkonzentration. Abb. C.22 zeigt, daß die Gegenwart von 3- bzw. 5 mM Tyrosinsulfat die Immunpräzipitation der Sekretogranine verglichen mit der Kontrolle ohne Tyrosinsulfat nicht signifikant beeinflusste.

Aus diesem Versuch ergab sich somit kein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Tyrosinsulfatgruppe an der immunologischen Kreuzreaktion von Antiserum 3 mit Sekretogranin I und II. Übereinstimmend damit zeigte ein weiteres tyrosinsulfatiertes Protein, das Dotterprotein der Fruchtfliege Drosophila melanogaster (Vitellogenin) (Bäuerle und Huttner, 1985), im Western-Blot keine Kreuzreaktion mit Antiserum 3 (nicht gezeigt).

(*): Die Analyse des hitzestabilen Überstands ergab ein Verhältnis des Methionineinbaus in Sekretogranin I und Sekretogranin II von etwa 1 zu 10, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Immunpräzipitation. Dagegen lag sowohl im Immunpräzipitat als auch im hitzestabilen Überstand der Sulfateinbau beider Sekretogranine etwa in der gleichen Größenordnung (Abb. C.21A, vgl. Spur 9 und 10). Die geringe Menge an Methionin im immunpräzipitierten Sekretogranin I ist folglich auf geringen Methionineinbau und nicht etwa auf unvollständige Präzipitation zurückzuführen.

Abb. C.22: Immunpräzipitation der Sekretogranine in Gegenwart von Tyrosinsulfat (TOS).

In einem Gesamtvolumen von 150 μl wurden 10 μg (^{35}S)-methioninmarkierter PC12-Zellproteine (Tritonextrakt, s. Methoden B.7.5.3) mit 20 μl Antiserum 3 unter Kontrollbedingungen (kein TOS) und in Gegenwart von 3- bzw. 5 mM TOS inkubiert. Nach 3 Stunden wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Bindung an Staphylococcus aureus-Suspension (Inkubationszeit 15 min) isoliert (s. Methoden B.7.5.2) und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Sekretogranin I (SG I) und II (SG II) wurden durch Scintillationszählung quantifiziert.

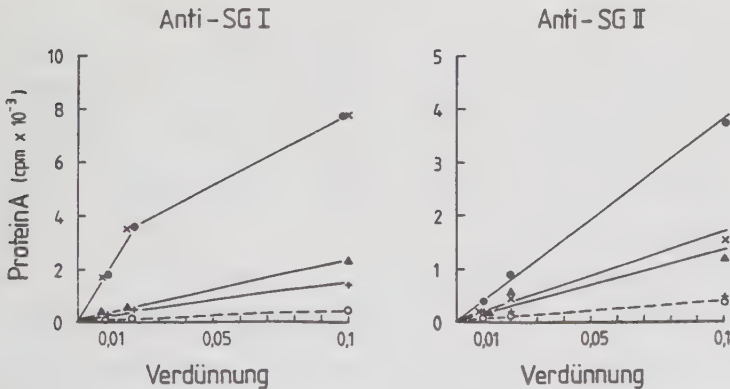


C.2.2.3.2 Vergleich der Antikörpertiter der Boosterseren

Die Antikörpertiter der Boosterseren von Antiserum 1 und 2 wurden durch Dot-Blot-Technik untersucht. Dazu wurden angereicherte Sekretogranine punktförmig auf Nitrocellulosefilter aufgetragen. Nach Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen der Antiseren wurde die Menge der gebundenen Antikörper durch Bindung von radiojodiertem Protein A und anschließende Szintillationszählung quantifiziert. Antiserum 1 zeigte eine deutliche Immunreaktion bereits nach dem ersten Booster. Der Titer stieg bis zum dritten Booster an und blieb beim vierten Booster konstant. Bei Antiserum 2 war eine Immunantwort erst nach dem zweiten Booster zu erkennen, und der Titer stieg bis einschließlich zum vierten Booster stark an (Abb. C.23).

Abb. C.23: Vergleich der Antikörpertiter der Boosterseren von Antiserum 1 und 2 durch Dot-Biot-Analyse.

Angereicherte Sekretogranine (hitze stabiler Überstand, s. Methoden B.6) auf Nitrozellulosefiltern wurden mit Verdünnungen der Antiseren 1 (Anti-SG I) und 2 (Anti-SG II) inkubiert. Die Menge der gebundenen Antikörper wurde durch Bindung von radiojodiertem Protein A quantifiziert (Methoden B.7.4). (O) Präimmunserum; (+, ▲, X, ●) 1.- bis 4. Boosterserum. Daß die Bindungskurve des 3.- und 4. Boosterserums von Anti-Sekretogranin I bei der Verdünnung 1:10 nicht mehr linear verläuft, ist vermutlich auf limitierende Mengen des an das Filter gebundenen Antigens zurückzuführen.



C.2.2.3.3 Kreuzreaktion mit Sekretograninen anderer Species

Die gegen Ratten-Sekretogranine gewonnenen Antiseren 1, 2 und 3 erkannten auch die Sekretogranine aus den Geweben des Rinds (Abb. C.27 und C.28). Weiterführende Arbeiten von Dr. P. Rosa haben gezeigt, daß Antiserum 1 auch mit Sekretogranin I aus menschlichen Tumorgeweben reagiert.

C.2.2.4 Depolarisationsstimulierte Sekretion von Katecholaminen und Sekretograninen aus PC12-Zellen

C.2.2.4.1 Sekretion von Noradrenalin

Der Mechanismus der depolarisationsstimulierten Sekretion verläuft über die Öffnung von Calciumkanälen der Plasmamembran. Der resultierende Einstrom von Calciumionen in das Cytoplasma löst die Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran aus.

Zunächst sollte überprüft werden, ob bei dem in unserem Labor verwendeten Subklon der PC12-Zellen (PC12/II-251) die regulierte Sekretion von Katecholaminen durch Depolarisation mit 55 mM Kaliumchlorid stimulierbar ist, wie für die Originalzelllinie beschrieben (Greene und Rein, 1977). Dafür wurden PC12-Zellen mit (^3H)-Noradrenalin beladen und mit 5 mM- (Kontrolle) oder 55 mM Kaliumchlorid (Depolarisation) inkubiert. Im Depolarisationsmedium war die Natriumchloridkonzentration entsprechend reduziert, um physiologische Osmolarität zu gewährleisten.

Abb. C.24 zeigt den Zeitverlauf der depolarisationsstimulierten Sekretion. Während der ersten 10 Minuten stieg die Menge an depolarisationsabhängig sezerniertem Noradrenalin stark an und erreichte nach etwa 20 Minuten ein Plateau. Zu diesem Zeitpunkt lag die stimulierte Sekretion um einen Faktor 3,6 bis 6,6 höher als die Freisetzung unter Kontrollbedingungen (Tabelle C.7). In calciumfreiem Depolarisationsmedium war die Noradrenalinsekretion durch 55 mM Kaliumchlorid nicht stimulierbar (Tabelle C.7, vgl. Greene und Rein, 1977).

Abb. C.24: Zeitverlauf der depolarisations-stimulierten Sekretion von Noradrenalin.

Konfluente PC12-Zellen wurden 1 Stunde lang mit (^3H)-Noradrenalin markiert und anschließend durch Depolarisation mit 55 mM Kalium die Sekretion stimuliert. (s. Methoden B.3.4.1). Für jeden Zeitpunkt wurden 2 Kulturen mit Kontrollmedium (5 mM KCl, offene Kreise) oder Depolarisationsmedium (55 mM KCl, geschlossene Kreise) inkubiert. Die Radioaktivität von Noradrenalin in Medien und Zellen nach der Inkubation wurde durch Scintillationszählung bestimmt. Der Anteil des sezernierten Noradrenalins wurde berechnet als $100 \times \text{cpm}_{\text{Medium}} : (\text{cpm}_{\text{Medium}} + \text{cpm}_{\text{Zellen}})$.

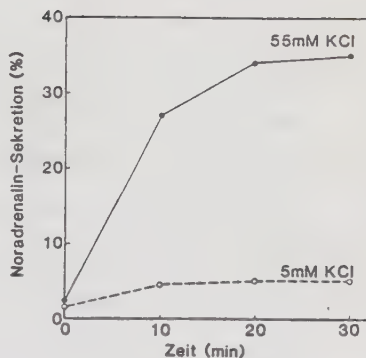


Tabelle C.7: Depolarisationsstimulierte Sekretion von Noradrenalin aus PC12-Zellen.

Die Zellen wurden mit Noradrenalin beladen und die Sekretion stimuliert wie in Abb. C.24 beschrieben. Der Anteil des sezernierten Noradrenalins wurde durch Scintillationszählung quantifiziert.

Versuch Nr.	Inkubationszeit (min)	Ca^{2+} (mM)	K^{+} (mM)	Sekretion - (% der Gesamtinkorporation ¹)	Stimulation durch 55 mM K^{+} ²
1	15	2,2	5	9,5	
			55	34,5	3,6
2	20	2,2	5	5,1	
			55	34,5	6,6
3	15	2,2	5	6,2	
			55	41	6,6
		0	5	3,5	
			55	3,5	1

(1): Sekretion = $100 \times \text{cpm}_{\text{Medium}} : (\text{cpm}_{\text{Medium}} + \text{cpm}_{\text{Zellen}})$

(2): Stimulation = $\text{Sekretion}_{55\text{mM}} : \text{Sekretion}_{5\text{mM}}$

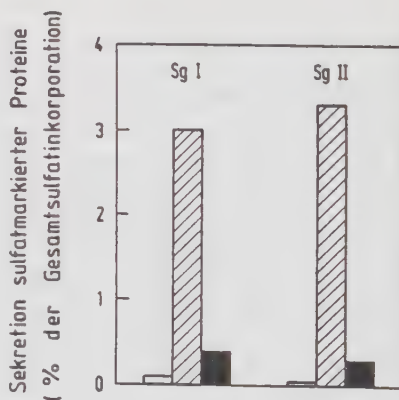
C.2.2.4.2 Sekretion der Sekretogranine

PC12-Zellen wurden 20 Stunden mit (^{35}S)-Sulfat markiert und 15 Minuten in Gegenwart von 5- oder 55 mM Kaliumchlorid inkubiert. Die Sekretogranine wurden durch Immunpräzipitation aus den Medien und den Zellen isoliert und quantifiziert.

Unter Kontrollbedingungen wurden weniger als 0,1% der sulfatmarkierten Sekretogranine ins Medium freigesetzt (Abb. C.25, offene Balken). Durch Depolarisation mit 55 mM Kaliumchlorid wurde die Sekretion der Sekretogranine auf etwa das 50-fache des Kontrollwerts erhöht (Abb. C.25, schattierte Balken). Die Sekretion der Sekretogranine wurde also durch den gleichen Stimulus ausgelöst wie die Noradrenalinsekretion.

Abb. C.25: Depolarisationsstimulierte Sekretion der Sekretogranine.

Konfluente PC12-Zellen wurden 20 Stunden lang mit (^{35}S)-Sulfat markiert und anschließend durch Depolarisation mit 55 mM Kalium die Sekretion stimuliert (s. Methoden B.3.4.2). Jeweils 2 Kulturen wurden 15 min mit Kontrollmedium (5 mM KCl, 2,2 mM CaCl_2 , offene Säulen), Depolarisationsmedium (55 mM KCl, 2,2 mM CaCl_2 , schattierte Säulen) oder mit 10 mM MgCl_2 enthaltendem Depolarisationsmedium (gefüllte Säulen) inkubiert. Die Sekretogranine wurden durch Immunpräzipitation aus Medien und Zellen isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Szintillationszählung quantifiziert. Der Anteil der sezernierten Sekretogranine wurde berechnet als $100 \times \text{cpm}_{\text{Medium}} : (\text{cpm}_{\text{Medium}} + \text{cpm}_{\text{Zellen}})$.



In calciumfreiem Medium dagegen zeigten die Sekretogranine ein vom Noradrenalin abweichendes Verhalten: Während sich der Kontrollwert der Noradrenalinsekretion im calciumfreien Medium nicht signifikant vom Kontrollwert in Anwesenheit von 2,2 mM Calcium unterschied (Tabelle C.7, Versuch Nr. 3), war die Freisetzung der Sekretogranine im calciumfreien Medium um ein Vielfaches über den Kontrollwert in Gegenwart von Calcium erhöht (Daten nicht gezeigt). Deshalb war es notwendig, mit einer anderen Methode zu überprüfen, ob die in Anwesenheit von Calcium durch 55 mM Kaliumchlorid stimulierte Freisetzung der Sekretogranine ein spezifischer Vorgang, d.h. durch Depolarisation und anschließenden Einstrom von Calcium in das Cytoplasma ausgelöst war. Dazu wurde die Tatsache ausgenützt, daß Magnesiumionen reversibel die Calciumkanäle blockieren, wodurch sich Calciumeinstrom und Exocytose inhibieren lassen (Douglas, 1968). In Gegenwart von 10 mM Magnesiumionen war die depolarisationsstimulierte Sekretion der Sekretogranine um etwa 90% inhibiert (Abb. C.25, ausgefüllte Balken).

C.2.2.5 Nachweis der Sekretogranine in Hypophyse und Nebenniere (Zusammenarbeit mit Dr. P. Rosa)

Vorbemerkung: Während meiner Arbeiten zur Reinigung der Sekretogranine hatte sich herausgestellt, daß die Sekretogranine aus PC12-Zellen und ein sulfatiertes, sekretorisches Protein aus Adenohypophyse und Nebennierenmark des Rinds bei der SDS-PAGE komigrierten, und daß das Protein aus Rindergeweben ebenso wie die Sekretogranine hitzestabil ist (vgl. Fragestellung, C.2.1).

Daher wurde die mögliche Verwandtschaft der beiden Proteine untersucht. Die vergleichende Charakterisierung der Sekretogranine, die in Abschnitt C.2.2.5 und C.2.2.6 dargestellt ist, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. P. Rosa in unserem Labor durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten sollen die Beweise für die Identität von Sekretogranin II aus PC12-Zellen und dem sulfatierten Protein aus der Rinderhypophyse erörtert werden. Zur Vereinfachung der Nomenklatur wird bereits im Verlauf der Beweisführung das Ergebnis quasi vorweggenommen, und beide Proteine werden als Sekretogranin II bezeichnet - unabhängig von ihrer Herkunft aus Zellkulturen oder Gewebe.

Beim Vergleich der PC12-Zellen und der Rindergewebe wurde auch Sekretogranin I erstmals in der Hypophyse und im Nebennierenmark des Rinds nachgewiesen. Darüberhinaus wurden Ähnlichkeiten zwischen den Sekretograninen und Chromogranin A festgestellt (vgl. Fragestellung, Abschnitt C.2.1). Die Ergebnisse werden deshalb für Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A parallel dargestellt.

C.2.2.5.1 Elektrophoretische Komigration von Sekretogranin I und II aus PC12-Zellen und aus Rindergeweben (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Erste Hinweise auf eine mögliche Identität von Sekretogranin II aus PC12-Zellen und dem sulfatierten sekretorischen Protein aus der Rinderhypophyse hatten sich aus der Komigration beider Proteine in der eindimensionalen SDS-PAGE ergeben, bei der die

Abb. C.26: Nachweis von Sekretogranin I und II in der Adenohypophyse und im Nebennierenmark, 1: zweidimensionale PAGE. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Die hitzestabilen Proteine aus der Rinderhypophyse und aus chromaffinen Granula des Rindernebennierenmarks sowie (^{35}S)-sulfatmarkierte PC12-Zellproteine wurden gemischt und durch zweidimensionale PAGE analysiert (1. Dimension: IEF, pH-Bereich von 4 bis 6,5; 2. Dimension: SDS-PAGE). (A, B): Adenohypophyse (70 μg Protein) gemischt mit PC12-Zellen (5 μg Protein); (C, D): chromaffine Granula (50 μg Protein) gemischt mit PC12-Zellen (5 μg Protein); (E): Adenohypophyse (30 μg Protein) gemischt mit chromaffinen Granula (50 μg Protein). (A, C und E): Proteinfärbung mit Coomassie Blau, (B und D): Fluorographie. Pfeilspitzen: 105 kD-Variante von Sekretogranin I; Pfeile: Sekretogranin II; offene Pfeile: Chromogranin A.

PROTEINFÄRBUNG

FLUOROGRAPHIE

A

B

C

D

E

BASISCH SAUER

BASISCH SAUER

Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (nicht gezeigt). Um die Komigration der beiden Proteine genauer zu untersuchen, wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt (isoelektrische Fokussierung gefolgt von SDS-PAGE), die eine bessere Auflösung der Proteinbanden ergibt. Dazu wurden die hitzestabilen Proteine der Adenohypophyse bzw. chromaffiner Granula des Rinds mit sulfatmarkiertem PC12-Zellhomogenat gemischt und zweidimensional aufgetrennt. Die Menge des PC12-Zellhomogenats wurde so gering gehalten, daß die PC12-Zellproteine durch Coomassie Blau-Färbung nicht nachweisbar waren. Die Proteinfärbung der Gele zeigt also ausschließlich die hitzestabilen Proteine der Rindergewebe (Abb. C.26A, C und E), die Fluorogramme zeigen die PC12-Zellproteine (Abb. C.26B und D). Ein Vergleich der Positionen von Sekretogranin II aus Rindergeweben und aus PC12-Zellen ergab, daß auch in der zweidimensionalen Elektrophorese die beiden Proteine komigrierten (Pfeile in Abb. C.26A bis D).

In der Position von Sekretogranin I, das in PC12-Zellen deutlich in zwei Varianten von 105- und 113 kD aufgelöst wird, war in den Rindergeweben nur eine Bande von 105 kD nachweisbar. Diese komigrierte exakt mit der sulfatmarkierten 105 kD-Variante des Sekretogranin I aus PC12-Zellen (Pfeilspitzen in Abb. C.26A bis D). Das Fehlen der 113 kD-Variante war eine Besonderheit der Gewebe des Rinds (vgl. dazu die Analyse von Geweben der Ratte, Abschnitt C.2.2.5.2).

Hypophyse und Nebennierenmark des Rinds enthielten jeweils unterschiedliche Konzentrationen von Sekretogranin I und II bzw. Chromogranin A: In der Hypophyse dominierte Sekretogranin II als

Hauptproteinbande des hitzestabilen Überstands und Sekretogranin I und Chromogranin A (offene Pfeile in Abb. C.26) kamen nur in Spuren vor. Im Nebennierenmark dagegen lag die Konzentration von Sekretogranin II an der unteren Nachweisgrenze der Proteinfärbung, während Sekretogranin I deutlich sichtbar war, die Menge beider Sekretogranine war gering im Vergleich mit Chromogranin A, dem Hauptprotein der chromaffinen Granula.

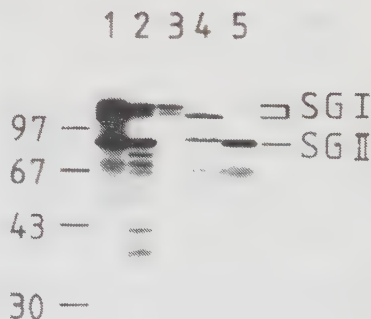
C.2.2.5.2 Immunologischer Nachweis von Sekretogranin I und II
und Chromogranin A in Ratten- und Rindergeweben
 (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Im vorangegangenen Abschnitt wurde durch Proteinfärbung gezeigt, daß in der Hypophyse und im Nebennierenmark des Rinds Proteine vorhanden sind, die bezüglich ihres Laufverhaltens in der zweidimensionalen Elektrophorese nicht von den Sekretograninen unterscheidbar sind. Um zusätzliche Beweise für die Identität der Proteine aus PC12-Zellen und Rindergeweben zu gewinnen, wurde durch Immunoblottechnik untersucht, ob gegen die Sekretogranine aus PC12-Zellen gewonnene Antiseren mit den Sekretograninen aus Rindergeweben kreuzreagieren. Dabei wurde auch die Rattennebenniere - das Stammgewebe der PC12-Zelllinie - sowie die Adenohypophyse der Ratte untersucht, da die PC12-Zellen als Tumorzellen nur bedingt repräsentativ für die Gewebe der Ratte sind. PC12-Zellhomogenat sowie die Gewebshomogenate von Ratte und Rind wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, nach Transfer auf Nitrocellulose mit Antiserum 3 inkubiert, das sowohl Sekretogranin I als auch Sekretogranin II erkennt

(vgl. Abb. C.20), und die gebundenen Antikörper durch radiojodiertes Protein A und Fluorographie nachgewiesen. Immunreaktivität gegen Sekretogranin I und II war sowohl in der Hypophyse als auch im Nebennierenmark beider Spezies nachweisbar (Abb. C.27). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der zweidimensionalen Gelelektrophorese war Sekretogranin I in den Rindergeweben nur als 105 kD-Variante nachweisbar (Spur 4 und 5). Dagegen enthielten die Rattengewebe sowohl die 105- als auch die 113 kD-Variante von Sekretogranin I (Spur 2 und 3).

Abb. C.27: Nachweis von Sekretogranin I und II in der Adenohypophyse und im Nebennierenmark, 2: Immunoblot von Rinder- und Rattengeweben. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

PC12-Zellen als Standard (1), Adenohypophyse und Nebenniere der Ratte (2, 3) sowie Nebennierenmark und Adenohypophyse des Rinds (4, 5) wurden durch Pottern in SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 100°C homogenisiert. Jeweils 100 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Sekretogranine wurden durch Inkubation mit Antiserum 3 (15 h, Verdünnung 1:100) und radiojodiertem Protein A (1 h, 0,1 µCi/ml) nachgewiesen. Die Fluorogramme wurden 5 h (Spur 1-3) bzw. 26 h (Spur 4 und 5) exponiert. Bei der Inkubation mit Präimmunserum waren unter diesen Bedingungen keine Banden sichtbar (nicht gezeigt). Die niedermolekularen Banden in Spur (2) sind proteolytische Fragmente der Sekretogranine (s.u., Abb. C.30). Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben.



Die Kreuzreaktion der gegen Sekretogranine aus PC12-Zellen

gewonnenen Antiseren mit den Proteinen aus Ratten- und Rindergeweben war ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß die Sekretogranine aus PC12-Zellen und die in den Geweben nachweisbaren Proteine identisch sind.

Neben Sekretogranin I und II, die im Immunoblot die Hauptbanden darstellten, erkannte das Antiserum noch einige niedermolekulare Proteinbanden geringerer Intensität. Um die Beziehung dieser Proteinbanden zu Sekretogranin I bzw. II zu charakterisieren, wurden exemplarisch das Rindernebennierenmark und die Rattennebenniere durch zweidimensionale Immunoblottechnik untersucht, und zwar mit Antiseren, die für Sekretogranin I, Sekretogranin II oder Chromogranin A spezifisch waren.

Dazu wurden die löslichen Proteine der chromaffinen Granula aus dem Nebennierenmark des Rinds sowie eine hitzestabile Fraktion der Rattennebenniere durch zweidimensionale Elektrophorese getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Proteine mit Amidoschwarz gefärbt (Abb. C.28A und E). Parallel mit dem gleichen Proteinmaterial hergestellte Filter wurden mit den spezifischen Antiseren inkubiert (Abb. C.28, B-D und F-H). Diese Antiseren erkannten als Hauptbande jeweils das Antigen, das zu ihrer Herstellung injiziert worden war. Darüberhinaus zeigte jedes Antiserum immunologische Kreuzreaktion mit einer Reihe von niedermolekularen Proteinen, die für Sekretogranin I, II und Chromogranin A(*) jeweils spezifisch waren. Aufgrund dieser immunologischen Kreuzreaktion ließen sich die niedermolekularen Proteine in drei Gruppen einteilen, die jeweils mit Sekretogranin I, Sekretogranin II oder Chromogranin A verwandt

(*) : Man beachte, daß das Molekulargewicht von Chromogranin A der Ratte (ca. 85 kD) höher war als das von Rinderchromogranin A (71 kD).

Abb. C.28: Immunologische Zuordnung der mit Sekretogranin I und II und Chromogranin A verwandten Proteine. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Die löslichen Proteine der chromaffinen Granula aus dem Rindernebennierenmark (A-D) oder die hitzestabile Proteinfraction der Rattennebenniere (E-H) wurden durch zweidimensionale Immunoblottechnik mit monospezifischen Antikörpern gegen Sekretogranin I und II bzw. Chromogranin A analysiert (Methoden B.7.3). (A, E) Proteinfärbung der Nitrozellulosefilter mit Amidoschwarz. (B-D, F-H) Fluorogramme der Immunoblots nach Bindung von (125 J)-Protein A; (B) Anti-Rindersekretogranin I (von Dr. Rosa), (F) Anti-Rattensekretogranin I (Antiserum 1), (C) Anti-Rindersekretogranin II (von Dr. Rosa), (G) Anti-Rattensekretogranin II (Antiserum 2), (D, H) Anti-Rinderchromogranin A (von Dr. Rosa). Pfeilspitzen: Sekretogranin I, Pfeile: Sekretogranin II, offene Pfeile: Chromogranin A, offener Pfeil mit Stern: hochsulfatierte Variante von Chromogranin A (vgl. Text, Abschnitt C.2.2.5.2). Man beachte, daß das apparente Molekulargewicht von Chromogranin A der Ratte (ca. 85 kD) höher war als das von Chromogranin A des Rinds (ca. 71 kD).



waren. In einem späteren Abschnitt wird gezeigt, daß es sich dabei um proteolytische Fragmente der Sekretogranine bzw. von Chromogranin A handelt (s. Abschnitt C.2.2.5.3).

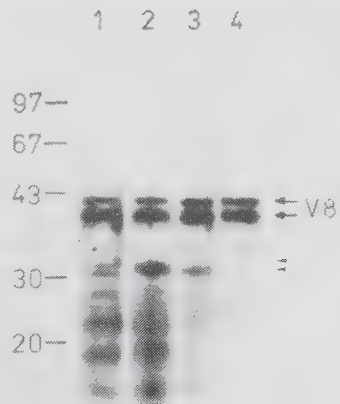
Der Antikörper gegen Rinderchromogranin A erkannte zusätzlich ein höhermolekulares, saures Protein, das an Kohlenhydraten sulfatiert ist (Rosa et al., 1985b), und das in Abschnitt C.2.2.5.3 näher charakterisiert wird.

C.2.2.5.3 Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, drei biochemisch distinkte Proteine (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Um Sequenzhomologien, d.h. Verwandtschaftsbeziehungen von Proteinen festzustellen, kann die Methode der limitierten Proteolyse herangezogen werden. Das Prinzip der Methode besteht darin, Protease und Versuchsbedingungen so zu wählen, daß nur ein Teil der Peptidbindungen gespalten werden und eine für jedes Protein charakteristische Mischung von Peptiden unterschiedlicher Länge und Ladung entsteht.

Abb. C.29: Vergleich von Sekretogranin II aus PC12-Zellen und der Adenohypophyse des Rinds durch limitierte Proteolyse nach Cleveland. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Durch zweidimensionale SDS-PAGE gereinigtes Sekretogranin II aus PC12-Zellen und aus der Rinderhypophyse wurden im Sammelgel einer SDS-PAGE durch V8-Protease hydrolysiert, die entstandenen Peptide aufgetrennt (15% Polyacrylamid im Trenngel) und durch Silberfärbung nachgewiesen (s. Methoden B.5.4.1). (1): Adenohypophyse des Rinds, die beiden Varianten von Sekretogranin II wurden in derselben Gelelektrophorese analysiert; (2, 3): PC12-Zellen, 86 kD-Variante (2) und 84 kD-Variante (3) von Sekretogranin II; (4): V8-Protease allein. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben; Pfeile: V8-Protease; Pfeilspitzen s. Text.



Zum Vergleich von Sekretogranin II aus PC12-Zellen und aus der Rinderhypophyse wurde die Methode nach Cleveland verwendet (s. Methoden B.5.4.1). Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Proteine im Gemisch mit der Protease einer SDS-PAGE unterworfen. Im Sammelgel wandern Protein und Protease zusammen, sodaß die Proteolyse während des Elektrophoreselaufs stattfindet. Im Trenngel werden die Protease und die entstandenen Peptide entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander getrennt. Es wurde V8-Protease aus Staphylococcus aureus verwendet, eine Endoprotease, die bevorzugt am Carboxyterminus von Asparagin- und Glutaminsäure spaltet.

Diese Analyse wurde für Sekretogranin II aus PC12-Zellen und aus der Rinderhypophyse durchgeführt, die jeweils durch 2D-PAGE zur Homogenität gereinigt worden waren. Die Peptide wurden durch Silberfärbung nachgewiesen. Die zwei Varianten von Sekretogranin II aus PC12-Zellen (86- bzw. 84 kD) wurden getrennt analysiert (Abb. C.29, Spur 2 und 3) und lieferten fast identische Peptidmuster. Lediglich ein Peptid in der Region von 30 kD (Pfeilspitzen) zeigte geringfügig unterschiedliche Laufeigenschaften. In Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht der beiden Proteinvarianten lieferte Sekretogranin II/86 kD das Peptid mit dem höherem Molekulargewicht. Bei Sekretogranin II aus der Rinderhypophyse wurden beide Varianten zusammen analysiert (Abb. C.29, Spur 1). Vergleicht man das Peptidmuster der beiden Proteine aus PC12-Zellen und aus der Rinderhypophyse, so sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Dieses Ergebnis spricht zusätzlich für eine enge Verwandtschaft der beiden untersuchten Proteine.

Die Hydrolyse mit V8-Protease nach Cleveland liefert nur wenige, relativ große Peptide und trennt die Peptide nur eindimensional nach ihrem Molekulargewicht auf. Dementsprechend erlaubt diese Methode nur einen groben Vergleich von Proteinen. Sie eignet sich jedoch dazu, Proteine aus verschiedenen Species (hier Ratte und Rind) zu vergleichen, bei denen immer geringfügige Unterschiede homologer Proteine (Speciesunterschiede) zu erwarten sind.

Wesentlich empfindlicher ist eine zweite Methode, der Vergleich tryptischer Peptidmuster, d.h., einer zweidimensionalen Auftrennung der Peptide, die bei der tryptischen Spaltung radiojodierter Proteine entstehen (Elder et al., 1977). Diese Methode erlaubt in sequenzzhomologen Proteinen den Nachweis von Punktmutationen, die den Austausch nur einer einzigen Aminosäure zur Folge haben. Wegen der zu erwartenden Speciesunterschiede können mit dieser Methode nur Proteine einer Species miteinander verglichen werden.

Für einen genaueren Vergleich der Sekretogranine I und II und von Chromogranin A aus verschiedenen Geweben einer Species wurden exemplarisch die Proteine aus Rindergeweben untersucht. Dabei wurden gleichzeitig die niedermolekularen Peptide, die mit spezifischen Antiseren gegen Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A kreuzreagierten analysiert (vgl. Abb. C.28). Die hitzestabilen Proteine aus der Adenohypophyse und aus chromaffinen Granula des Nebennierenmarks wurden durch zweidimensionale PAGE aufgetrennt (Abb. C.30A und B), im Gelstück mit ^{125}J markiert und mit Trypsin hydrolysiert. Die eluierten

Abb. C.30: Sekretogranin I und II und Chromogranin A, drei distinkte Proteine. - Vergleich der tryptischen Fingerprints. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Die hitzestabilen Proteine (vgl. Methoden B.4.2 und B.6.2) von chromaffinen Granula des Rindernebennierenmarks (A) und von der Rinderhypophyse (B) wurden durch zweidimensionale PAGE getrennt und mit Coomassie Blau gefärbt (A, B). Einzelne in A und B gekennzeichnete Proteine wurden im Gel radiojodiert, mit Trypsin hydrolysiert, die entstehenden Peptide auf Dünnschichtplatten zweidimensional getrennt (s. Schema rechts oben) und durch Fluorographie nachgewiesen (s. Methoden B.5.4.2). Pfeilspitzen: Sekretogranin I und damit verwandte Proteine (Pfeilspitzen ohne Bezeichnung in A: p63, p45 und p43, Peptidmuster nicht gezeigt); Pfeile: Sekretogranin II und verwandte Proteine; Offene Pfeile: Chromogranin A und verwandte Proteine (offener Pfeil ohne Bezeichnung in A: p51, Peptidmuster nicht gezeigt).



Peptide wurden durch Dünnschichtelektrophorese und anschließende ansteigende Verteilungschromatographie zweidimensional aufgetrennt. Die Peptidmuster von Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A waren für alle drei Proteine klar unterschiedlich (Abb. C.30, Mitte). Der Vergleich der tryptischen Peptide jedes einzelnen Proteins aus den beiden Geweben zeigte jedoch - in Übereinstimmung mit der Cleveland-Methode (s. Abb. C.29) - keine signifikanten Unterschiede.

Die tryptischen Fingerprints der übrigen hitzestabilen Proteine (linke und untere Reihe), konnten aufgrund ihrer Peptidmuster in drei Gruppen eingeteilt werden: p94, p90, p82, p67, p63 (nicht gezeigt), p54, p45 und p43 (die beiden letzteren nicht gezeigt) lieferten dem Sekretogranin I ähnliche Fingerprints, p66 und p64 waren mit Sekretogranin II und p92, p62 und p51 (letzteres nicht gezeigt) mit Chromogranin A vergleichbar. Die Proteine jeder dieser drei Gruppen waren dieselben, die aufgrund der Kreuzreaktion im zweidimensionalen Immunoblot Sekretogranin I, II bzw. Chromogranin A zugeordnet worden waren (vgl. Abb. C.28).

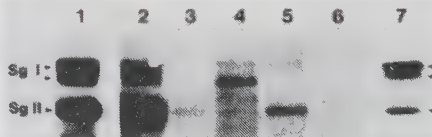
Innerhalb jeder Verwandtschaftsgruppe war zu beobachten, daß mit abnehmendem Molekulargewicht der Proteine bestimmte Peptide verschwanden. Aufgrund dieser Ergebnisse können die untersuchten Proteingruppen als proteolytische Fragmente von Sekretogranin I, II und Chromogranin A angesehen werden. Die Zuordnung von p62 und p51 zu Chromogranin A bestätigt die Ergebnisse von O'Connor und Frigon (1984), die diese Proteine als Chromogranin B und C bezeichnet haben. p92 besitzt ein höheres Molekulargewicht als Chromogranin A, während die tryptischen Fingerprints beider Proteine nicht unterscheidbar sind. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß p92 eine stark sulfatierte Form von Chromogranin darstellt (Rosa et al., 1985b).

Zusammenfassung der Kapitel C.2.2.5.1 bis C.2.2.5.3

Für jedes der beiden Proteine, Sekretogranin I und Sekretogranin II, konnte folgendes gezeigt werden: Die Proteine aus PC12-Zellen und aus Geweben (Hypophyse und Nebennierenmark) zweier Spezies (Rind und Ratte) zeigten jeweils identische Laufeigenschaften in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen sowie immunologische Kreuzreaktion. D.h., sie besitzen dasselbe Molekulargewicht, denselben isoelektrischen Punkt und gemeinsame antigene Determinanten. Die Peptidmuster jedes einzelnen Proteins aus Hypophyse und Nebennierenmark zeigten keine Unterschiede. Demzufolge enthalten sowohl PC12-Zellen als auch Rindergewebe dieselben Proteine, Sekretogranin I bzw. II. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Peptidmuster sind Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A distinkte Proteine.

Abb. C.31: Nachweis der Sekretogranine in endokrin sekretorischen Geweben der Ratte durch kombinierte Immunpräzipitation und Immunoblot-Analyse. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Die Sekretogranine wurden aus Rattengewebe durch Immunpräzipitation angereichert (s. Methoden B.7.5.4), durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblottechnik nachgewiesen. Dazu wurde ein Gemisch der Antiseren 1 und 2 (oben) bzw. Präimmunserum (unten) verwendet (Verdünnung 1:100 in PBS mit 5% Rinderserumalbumin, 5% Hämoglobin, 0,25% Gelatine und 0,01% NaN_3 , 5 h Inkubation). Die gebundenen Antikörper wurden durch radiojodiertes Protein A nachgewiesen (Methoden B.7.3). Spur (1) und (7), Standard-Sekretogranine: Gesamthomogenat der Rattenhypophyse (Spur 1, 100 μg Protein) und PC12-Zellen (Spur 7, 40 μg Protein); Spur (2-6), Immunpräzipitate aus Rattenhirn (Spur 2, Ausgangsmaterial 4,32 mg Protein im Homogenat), Pankreas (Spur 3, 4,165 mg Protein), Duodenum (Spur 4, 3,885 mg Protein), Schilddrüse (Spur 5, 1,6 mg Protein) und Submaxillarspeicheldrüse (Spur 6, 4,0 mg Protein). Die Expositionszeiten betrugen 4 h für Spur 1 und 7 bzw. 30 h für Spur 2-6.



C.2.2.6 Vorkommen der Sekretogranine in endokrin-sekretorischen Geweben der Ratte. (Zusammenarbeit mit Dr. Rosa)

Im Folgenden wird mit immunbiochemischen Methoden das Vorkommen der Sekretogranine in weiteren endokrin sezernierenden Geweben untersucht. Dafür wurden Rattengewebe verwendet, da die vorliegenden, spezifisch gegen Sekretogranin I und II gerichteten Antiseren gegen Rattenproteine gewonnen wurden.

Vier Gewebe, die endokrin sekretorische Zellen enthalten (Gehirn, Pankreas, Duodenum und Schilddrüse) sowie die überwiegend exokrin sezernierende Submaxillarspeicheldrüse wurden auf ihren Gehalt an Sekretograninen hin untersucht. Einfache Immunoblot-Analyse der Gewebshomogenate hatte nur sehr schwache Signale in der Region der Sekretogranine geliefert (nicht gezeigt). Um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, wurden die Sekretogranine zunächst durch Immunpräzipitation aus den Homogenaten der genannten Gewebe angereichert (s. Methoden B.7.5.4). Das Immunpräzipitat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und eine Immunoblot-Analyse mit einem Gemisch von Anti-Sekretogranin I- und Anti-Sekretogranin II-Antiserum durchgeführt. Gehirn, Duodenum und Schilddrüse enthielten beide Sekretogranine (Abb. C.30, Spur 2, 4 und 5). Im Pankreas wurde lediglich Sekretogranin II gefunden (Spur 3). In der Submaxillarspeicheldrüse waren keine Sekretogranine nachweisbar (Spur 6). Auch im Blutserum wurden mit dieser Methode keine Sekretogranine gefunden (nicht gezeigt). Letzteres zeigt, daß die in den Geweben nachgewiesenen, zum Teil sehr geringen Mengen von Sekretograninen nicht durch Kontamination der Gewebe mit Sekretogranine enthaltendem Blut erklärt werden können.

C.2.3 Diskussion

C.2.3.1 Sekretogranin I und II, zwei tyrosinsulfatierte, sekretorische Proteine aus PC12-Zellen

Die Sekretogranine sind ein weiteres Beispiel für tyrosinsulfatierte sekretorische Proteine. Sie werden auf dem regulierten Weg aus PC12-Zellen sezerniert (s. Abschnitt C.2.2.4.2). Solange die Sekretion nicht stimuliert wird, werden die Sekretogranine intrazellulär akkumuliert, sodaß ihre Konzentration mit 0,5% des Zellproteins bemerkenswert hoch liegt. Die regulierte Sekretion der Sekretogranine kann - ähnlich der Katecholaminsekretion - durch Depolarisation stimuliert werden (Abb. C.25). Nach 15-20 min Depolarisation wurden etwa 3% der sulfatmarkierten Sekretogranine sezerniert. Dieser Wert war niedriger als der Prozentsatz des sezernierten Noradrenalins (Tabelle C.7), er lag jedoch in derselben Größenordnung wie der Anteil anderer, nach Depolarisation aus Zellkulturen sezernierter Proteine und Peptide: Acetylcholinesterase (3%) und Enkephalin (8,2%) aus nicht transformierten chromaffinen Zellen und Dopamin- β -Hydroxylase (12%) aus PC12-Zellen (Mizobe und Livett, 1983; Livett et al., 1981; McHugh et al., 1985). Auch Mizobe und Livett (1983) und Livett et al. (1981) untersuchten parallel zur Proteinsekretion die depolarisationsstimulierte Sekretion von Katecholaminen. Sie fanden dabei dieselbe Diskrepanz zwischen dem Anteil sezernierter Proteine (3-12%) und Katecholamine (20-30% im Fall von Noradrenalin), wie sie bei der vorgelegten Arbeit beobachtet wurde (s. Abb. C.24 und C.25). Obwohl der Stimulus der Sekretion, die calciumabhängige Depolarisation, für Katecholamine und Sekretogranine derselbe war, sprachen die Unterschiede in der Quantität der sezernierten Substanzen dafür, daß die Sekretogranine und Katecholamine in unterschiedlichen sekretorischen Granula lokalisiert sind. Daß PC12-Zellen

mindestens zwei Typen sekretorischer Granula besitzen, nämlich Adrenalin- und Noradrenalin-speichernde chromaffine Granula, zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen (Greene und Tischler, 1976). Auch proteinbiochemische Daten erlauben die Unterscheidung verschiedener Typen sekretorischer Vesikel: so kommt ein integrales Membranprotein, p38, in synaptischen Vesikeln von Nervenzellen und in kleinen, wenig elektronendichten Vesikeln des Nebennierenmarks bzw. der PC12-Zellen vor, nicht aber in chromaffinen Granula (Wiedenmann und Franke, 1985). Neben den quantitativen Unterschieden bei der depolarisationsstimulierten Sekretion spricht auch die vermehrte Freisetzung von Sekretograninen in calciumfreiem Medium gegen eine Kolokalisation der Sekretogranine mit Noradrenalin (s. Abschnitt C.2.2.4.2).

In Übereinstimmung mit der depolarisationsstimulierten Sekretion aus PC12-Zellen wurden die Sekretogranine durch Immuncytochemie in sekretorischen Granula lokalisiert (Rosa et al., 1985b): Sowohl in PC12-Zellen (P. Rosa, unveröffentlicht) als auch in Geweben (Abb. C.32 und C.33) konzentrierte sich die Immunfluoreszenz von Anti-Sekretogranin-Antikörpern auf die perinukleäre Region (Golgi-Apparat) und auf unter der Plasmamembran liegende punktförmige Strukturen, die sekretorischen Granula. Darüberhinaus konnte am Beispiel der Adenohypophyse durch elektronenmikroskopische Immuncytochemie gezeigt werden, daß Sekretogranin II im löslichen Inhalt sekretorischer Granula gespeichert ist (Rosa et al., 1985a).

Eine Reihe von Voraussetzungen lassen die Sekretogranine als

Modellproteine geeignet erscheinen, um eine mögliche Bedeutung der Tyrosinsulfatierung für den Prozeß der Sekretion und der Sortierung dieser Proteine in den regulierten Weg zu untersuchen:

1) Die Sekretogranine sind abundante Proteine und die am stärksten sulfatierten Proteinbanden in PC12-Zellen. Nach (^{35}S)-Sulfatmarkierung können sie leicht identifiziert und quantifiziert werden (Abb. C.10).

2) Zur Isolierung der Sekretogranine aus Zelllysaten und Medien liegen monospezifische Antiseren vor (Abb. C.20).

3) Die PC12-Zellen sind ein gut charakterisiertes Modellsystem zur Untersuchung der Proteinsekretion (Greene und Rein, 1977; Ahnert-Hilger et al., 1985).

Ob die Tyrosinsulfatierung dieser Proteine notwendig ist für ihre Sekretion, könnte mit Hilfe spezifischer Inhibitoren der Tyrosinsulfatierung untersucht werden. Bisher kennt man allerdings nur Inhibitoren, die allgemein die Sulfatierung, also auch die Kohlenhydratsulfatierung hemmen. Ein Beispiel dafür ist das Sulfatanalog Chlorat (Bäuerle und Huttner, 1986).

Ein weiterer Ansatz, um die Bedeutung der Tyrosinsulfatgruppe zu untersuchen, ist die Expression unsulfatierter Proteine in Zellkulturen nach Mutagenese, die Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt (vgl. Abschnitt A.4.4). Dazu müßte das sulfatierte Tyrosin der Sekretogranine identifiziert werden.

C.2.3.2 Diskussion der Reinigung der Sekretogranine aus PC12-Zellen

Die Reinigung der Proteine aus Zellkulturzellen bot sowohl Vor-

als auch Nachteile:

- Es standen nur begrenzte Mengen an Ausgangsmaterial zur Verfügung, da die Anzucht der Zellen kostspielig und zeitaufwendig ist. Daher wurde bei den Vorversuchen nur wenig Material eingesetzt, und die Streuung der Meßwerte lag dementsprechend relativ hoch (Abschnitt C.2.2.2.1 - 2.2.2.3). Auf eine statistisch abgesicherte Quantifizierung der Anreicherungsfaktoren bei der präparativen Reinigung mußte verzichtet werden.
- Ein entscheidender Vorteil der Anreicherung aus Gewebekulturen bestand darin, daß die Sekretogranine in den PC12-Zellen sehr effizient mit radioaktivem Sulfat markiert werden konnten. Die in vivo-Markierung von Gewebestücken ist im Prinzip möglich, liefert jedoch vergleichsweise geringe Einbauraten (Rosa, unveröffentlicht).
- In den PC12-Zellen kommen sowohl Sekretogranin I als auch Sekretogranin II in relativ hoher Konzentration vor (vgl. Abb. C.10 und C.19). Die Hypophyse dagegen enthält hauptsächlich Sekretogranin II und nur Spuren von Sekretogranin I. Im Nebennierenmark der Ratte, das zudem nur wenige Milligramm wiegt (Gesamtgewicht der Nebenniere: 40 mg), überlappt Chromogranin A bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit Sekretogranin II (Abb. C.28E). Da Chromogranin A wie die Sekretogranine hitzestabil ist, wäre die Gewinnung homogener Proteine aus dem Nebennierenmark schwierig. Für die Reinigung der Sekretogranine der Ratte erwies sich demnach die PC12-Zelllinie als günstigstes Ausgangsmaterial.

Der wirksamste Schritt bei der Reinigung der Sekretogranine war

die Hitzebehandlung, die gleich zu Beginn der Aufarbeitung die Proteinmenge drastisch verringerte (Abb. C.17, Tabelle C.5). Infolgedessen konnte bei der Anionenaustauschchromatographie das Bettvolumen der Säule klein gehalten werden, wodurch sich die Laufzeit des Elutionsgradienten auf 3-5 Stunden beschränkte und die Sekretogranine in einem Volumen von wenigen ml eluiert wurden. Die DEAE-Chromatographie trennte hauptsächlich die sulfatierten Proteoglykane ab, die bei der SDS-PAGE mit den Sekretograninen überlappten. Bis zu diesem Punkt nahm die Sekretograninreinigung nur etwa 30 Stunden in Anspruch.

Die Sekretogranine stellten jeweils etwa 20% der mit Coomassie Blau detektierten Proteine des DEAE-Eluats (Abb. C.18). Die kontaminierenden Proteine wurden durch zweidimensionale PAGE gut von den Sekretograninen abgetrennt (Abb. C.19), sodaß als letzter Reinigungsschritt eine präparative zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt wurde. Auf zusätzliche Versuche, die Sekretogranine durch konventionelle Methoden (z.B. durch fraktionierte Präzipitation oder Chromatographie) weiter zu reinigen, wurde aus folgenden Gründen verzichtet:

- Aufgrund der begrenzten Mengen des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials mußten die Verluste und damit die Zahl der Reinigungsschritte möglichst gering gehalten werden.
- Aufgrund ihrer sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften verhielten sich Sekretogranin I und II bei allen untersuchten Reinigungsmethoden nahezu identisch.
- Primäres Ziel der Proteinreinigung war die Herstellung monospezifischer Antiseren und die Gewinnung von Daten zur

Aminosäurezusammensetzung bzw. Aminosäuresequenz. In beiden Fällen ist die Gewinnung hochreiner Proteine notwendig, was am besten durch die zweidimensionale Elektrophorese erreicht werden konnte. Die Denaturierung der Proteine durch SDS störte weder bei der Antigeninjektion noch bei der Sequenzierung tryptischer Peptide (s. Abschnitt C.2.3.4).

Eine alternative Möglichkeit zur Trennung von Sekretogranin I und II wurde durch die Gewinnung monospezifischer Antisera (s. Abb. C.20, Spur 1 und 2) ermöglicht: die Immunoaffinitätschromatographie mit immobilisierten Antikörpern. Diese Methode sollte dann angewendet werden, wenn native Proteine benötigt werden, wenn also Denaturierung durch Hitzebehandlung bzw. SDS-Zugabe vermieden werden müssen.

Die Hitzestabilität der Sekretogranine ist nicht nur im Hinblick auf die Proteinreinigung von Bedeutung. Sie erlaubt darüberhinaus Rückschlüsse auf die räumliche Struktur der Proteinmoleküle: Die Hitzedenaturierung von Proteinen wird darauf zurückgeführt, daß sich die Tertiärstruktur durch thermische Anregung auffaltet und die normalerweise im Inneren globulärer Proteine verborgenen hydrophoben Aminosäuren zur Wasserphase hin exponiert werden. Um die Entropie des Systems gering zu halten, treten dann die hydrophoben Aminosäuren verschiedener Moleküle in Wechselwirkung, und es entstehen große, unlösliche Proteinaggregate. Daß die Sekretogranine bei der Hitzebehandlung nicht präzipitieren, kann durch ihren hohen Gehalt an hydrophilen und sauren Aminosäuren erklärt werden: Sekretogranin II enthält 13,7 Mol Asparagin(säure) und 22 Mol Glutamin(säure) (Rosa et al.,

1985b). Es ist anzunehmen, daß die hydrophoben Aminosäuren der Sekretogranine relativ gleichmäßig über das Molekül verteilt und jeweils von Gruppen hydrophiler Aminosäuren umgeben sind. Das Molekül besitzt vermutlich keine langen hydrophoben Abschnitte, die intra- oder intermolekular mit anderen hydrophoben Domänen in Wechselwirkung treten könnten. Demnach ist für die Sekretogranine eine langgestreckte Struktur zu erwarten. Wo Faltungen des Moleküls stattfinden, sollten sie durch ionische Wechselwirkungen oder Cystinbrücken stabilisiert werden. Diese Überlegungen könnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen oder durch Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit, also des Reibungswiderstands der unter nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigten Sekretogranine überprüft werden.

C.2.3.3 Antiseren gegen Sekretogranine aus PC12-Zellen

Bei je zwei Injektionen von Sekretogranin I bzw. II aus PC12-Zellen wurden insgesamt drei Antiseren gewonnen. Während Antiserum 1 und 2 spezifisch das bei der jeweiligen Immunisierung verwendete Antigen erkannten, zeigte das dritte, gegen Sekretogranin I gewonnene Antiserum Kreuzreaktion mit Sekretogranin II (Abb. C.20). Da der letzte Reinigungsschritt eine zweidimensionale Gelelektrophorese gewesen war, schien eine Kontamination des injizierten Sekretogranin I mit dem niedermolekularen Sekretogranin II extrem unwahrscheinlich. D.h., es muß sich um echte Kreuzreaktion handeln. Das gemeinsame, für die Kreuzreaktion des Antiserums verantwortliche Epitop der Sekretogranine war nicht die Tyrosinsulfatgruppe, wie durch

Immunpräzipitation in Gegenwart der freien Aminosäure Tyrosinsulfat gezeigt wurde (Abb. C.22). Dagegen scheint eine Korrelation zu bestehen zwischen der bei der Proteinreinigung verwendeten Methode zur Proteinfärbung im SDS-Gel und der Spezifität der gewonnenen Antiseren: Die monospezifischen Antiseren wurden bei denjenigen Injektionen erhalten, bei denen die Proteine mit Kaliumchlorid gefärbt worden waren, während im Fall des kreuzreagierenden Antiserums mit Coomassie Blau gefärbtes Sekretogranin I injiziert worden war. Entsprechende Beobachtungen wurde bei der Injektion von Sekretograninen aus dem Rindernebennierenmark gemacht (Rosa, unveröffentlicht). Diese Korrelation könnte dadurch erklärt werden, daß Coomassie Blau an hydrophobe Domänen der Proteine bindet und somit einen Teil der antigenen Determinanten maskiert. Möglicherweise sind nach der Bindung von Coomassie Blau nur die Asparagin- und Glutaminsäure-reichen Domänen als antigene Determinanten aktiv, und diese könnten bei beiden Sekretograninen ähnliche Strukturen besitzen. Bisher ist nicht genau bekannt, in welchem Ausmaß zwischen Sekretogranin I und II Sequenzhomologien bestehen, die die immunologische Kreuzreaktion und die Ähnlichkeiten im biochemischen Verhalten der Proteine erklären könnten. Die Analyse der tryptischen Fingerprints von Sekretogranin I und II lieferte nur zwei gemeinsame Peptide, die als antigene Determinanten für das kreuzreagierende Antiserum in Frage kommen könnten (Rosa, unveröffentlicht).

C.2.3.4 Verwendungsmöglichkeiten der gereinigten Sekretogranine und der Anti-Sekretogranin-Antiseren

Die durch zweidimensionale PAGE zur Homogenität gereinigten Sekretogranine wurden zur Gewinnung spezifischer Antiseren eingesetzt (s. Abschnitt C.2.2.3).

Geplant war weiterhin die Darstellung desulfatierter Sekretogranine als natürliche Substrate der Tyrosylprotein-sulfotransferase. Alle Versuche der chemischen Desulfatierung scheiterten daran, daß gleichzeitig das Proteingrundgerüst degradiert und nur Peptide mit Molekulargewichten unter 30 kD wiedergefunden wurden (z.B. nach Säurebehandlung mit 1 N HCl, 5 min bei 100°C, vgl. Methoden B.9.2.1) (nicht gezeigt). Bisher wurden auch keine geeigneten Bedingungen gefunden, um proteingebundenes Tyrosinsulfat durch käufliche Arylsulfatasen enzymatisch zu hydrolysieren (Lee und Bäuerle, unveröffentlicht). In Zusammenarbeit mit P.A. Bäuerle und Dr. R. Frank (EMBL, Heidelberg) wurden tryptische Peptide der Sekretogranine sequenziert (nicht gezeigt). Die dabei gewonnenen Daten wurden für die Klonierung und DNA-Sequenzanalyse der Sekretogranine benötigt (s. unten, Verwendung der Antiseren). Weiterhin sollen die sulfatierten Peptide der Sekretogranine sequenziert und mit den Sequenzdaten anderer tyrosinsulfatierter Proteine verglichen werden, um festzustellen, ob sich aus der Umgebung der sulfatierten Tyrosine eine Erkennungssequenz für die Tyrosylprotein-sulfotransferase ableiten läßt (vgl. Abschnitt A.4.2).

Um die physiologische Funktion der Sekretogranine und den Mechanismus ihrer Sortierung beim Transport vom Golgi-Apparat in sekretorische Granula herauszufinden, können die gereinigten Sekretogranine in Bindungsstudien eingesetzt werden. Die dazu

notwendigen Untersuchungen werden in Abschnitt C.2.3.5.3 ausführlicher erläutert.

Die Antiseren gegen Sekretogranin I und II wurden zum immun-biochemischen Nachweis der Sekretogranine in verschiedenen Spezies und Geweben sowie zu ihrer Charakterisierung als sekretorische Proteine verwendet (Abschnitt C.2.2.5 und C.2.2.4.2).

Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind:

- Die Anreicherung der Sekretogranine durch Immunoaffinitätschromatographie (vgl. Abschnitt C.2.3.2).
- Immunoscreening von cDNA-Banken: Mit Hilfe von Antiserum 1 (vgl. Abb. C.20) haben U. Benedum und D. Konecki in unserem Labor aus einer cDNA-Bank (λ gt11) eines menschlichen Phäochromocytoms Klone für Sekretogranin I identifiziert und sequenziert (Benedum et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die Expression des Sekretograningens in Bakterien, die keine Tyrosinsulfatierung von Proteinen durchführen (Benedum und Huttner, unveröffentlicht), könnte z.B. zur Gewinnung unsulfatierter Sekretogranine dienen, die als Substrate im Enzymtest der Tyrosylproteinsulfotransferase gebraucht werden.

- Mit Hilfe der Antiseren konnte das Vorkommen der Sekretogranine in weiteren peptidsezernierenden Geweben untersucht werden. immunocytochemische Arbeiten von Dr. P. Rosa haben gezeigt, daß Sekretogranin I und II spezifisch und teilweise komplementär in peptidsezernierenden Zellen der Nebenniere, des Duodenums und anderer endokriner Gewebe vorkommen (Abb. C.32 und C.33). Durch die Untersuchung von pathogenen Geweben soll festgestellt werden, ob eine Korrelation besteht zwischen dem Vorhandensein der

Abb. C.32: Immuncytochemischer Nachweis der Sekretogranine in Adenohypophyse und Nebennierenmark der Ratte. (Durchgeführt von Dr. Rosa, s. Rosa et al., 1985b)

(a, b) Benachbarte Dünnschnitte ($1\ \mu\text{m}$) der in Epon eingebetteten Adenohypophyse wurden mit Anti-Sekretogranin I-Antiserum (a, Antiserum 1) oder Anti-Sekretogranin II-Antiserum (b, Antiserum 2) inkubiert und die gebundenen Antikörper durch einen zweiten, mit fluoreszierendem Rhodamin gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Die Zellen enthielten unterschiedliche Mengen beider Sekretogranine, dabei war das Vorkommen teilweise komplementär: während bestimmte Zellen überwiegend Sekretogranin I enthielten (Pfeilspitzen), wurden andere stärker mit Anti-Sekretogranin II-Antiserum gefärbt (Pfeile). Einige Zellen waren durch keines der beiden Antiseren färbbar. (Vergr. $\times 100$, Balken = $20\ \mu\text{m}$).

(c, d) Gefrierschnitte ($20\ \mu\text{m}$ dick) der Nebenniere wurden mit Antisekretogranin I-Antiserum (c) oder Anti-Sekretogranin II-Antiserum (d) inkubiert und die gebundenen Antikörper wie in (a, b) nachgewiesen. Die Nebennierenmarkszellen (M) enthielten mit wenigen Ausnahmen (Stern) beide Sekretogranine. In den Zellen der Nebennierenrinde (C) waren keine Sekretogranine nachweisbar. (Vergr. $\times 256$, Balken = $50\ \mu\text{m}$).

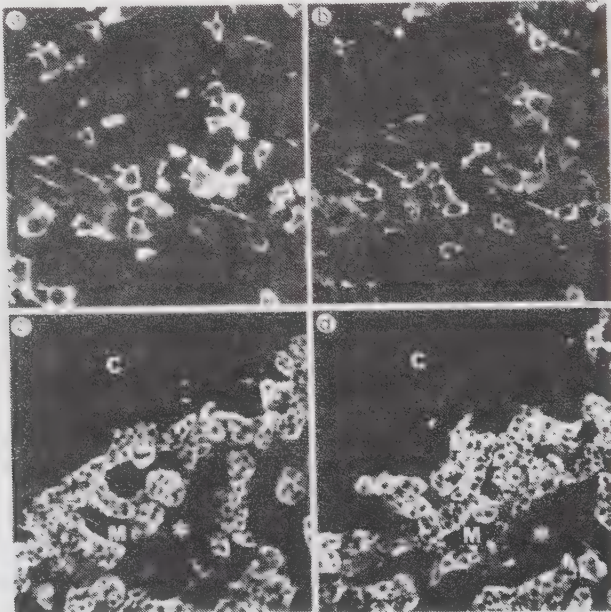
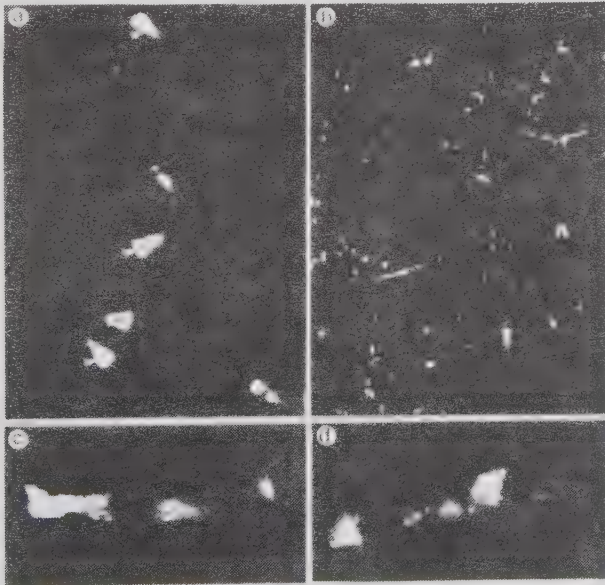


Abb. C.33: Immuncytochemischer Nachweis der Sekretogranine im Duodenum der Ratte. (Durchgeführt von Dr. Rosa, s. Rosa et al., 1985b)

Gefrierschnitte (10 μm dick) wurden mit Anti-Sekretogranin I-Antiserum (a und c, Antiserum 1) oder Anti-Sekretogranin II-Antiserum (b und d, Antiserum 2) inkubiert und gebundene Antikörper durch einen zweiten, mit fluoreszierendem Rhodamin gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Der Schnitt wurde im basalen Teil der Dünndarmzotten geführt, sodaß das Zentrum der scheibenförmigen Querschnitte das Dünndarlumen darstellt. Sekretogranin I war in vereinzelt, über die ganze Mucosa verteilten, Zellen zu finden, die die typische Morphologie und Verteilung endokrin-sekretorischer Zellen der Darmschleimhaut besaßen (Pfeilspitzen in a). Sekretogranin II war nur mit geringerer Intensität in solchen endokrinen Zellen der Mucosa nachweisbar (Pfeilspitzen in b). Dagegen war Anti-Sekretogranin II-Immunreaktivität im Nervenplexus des Dünndarms nachweisbar. (c und d): Stärkere Vergrößerung der endokrin-sekretorischen Zellen. Die punktförmige Verteilung der Immunfluoreszenz in den endokrinen Zellen der Mucosa ist mit einer Lokalisation des Antigens in sekretorischen Granula konsistent; (d) wurde mit stärkerem Kontrast gedruckt als (c), um das punktförmige Muster besser sichtbar zu machen. (a und b) Vergr. x 461, Balken = 20 μm , (c und d) Vergr. x 1440, Balken = 10 μm .



Sekretogranine und der Sekretion von Peptiden aus den entsprechenden Geweben, ob z.B. ein Defekt der Peptidsekretion mit dem Fehlen oder einer Veränderung der Sekretogranine einhergeht (vgl. Abschnitt C.2.3.5.3).

C.2.3.5 Die weite Verbreitung der Sekretogranine in peptid-sezernierenden Zelltypen

Sekretogranin I und II waren in einer Vielzahl endokrin sekretorischer und neuronaler Zelltypen nachweisbar (Abb. C.31 bis 33 und Rosa et al., 1985b). All diesen Zelltypen ist eines gemeinsam: Sie sezernieren Peptidhormone auf dem regulierten Weg. Die weite Verbreitung der Sekretogranine impliziert eine wichtige Funktion in den jeweiligen Geweben. Als Beitrag zur Aufklärung der bisher unbekannten Funktion wurden die Proteine biochemisch charakterisiert.

C.2.3.5.1 Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, drei distinkte Proteine

Die meisten Gewebe, in denen die Sekretogranine nachweisbar waren, enthalten gleichzeitig auch Chromogranin A (Lloyd und Wilson, 1983; O'Connor et al., 1983; Cohn et al., 1984; Somogyi et al., 1984). Daher schien es von Interesse, eine mögliche Beziehung zwischen Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A zu untersuchen.

Die immunologische und biochemische Charakterisierung von Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A zeigten jedoch, daß es sich um drei distinkte Proteine handelt. So

konnten spezifische Antiseren gegen jedes einzelne der drei Proteine gewonnen werden, die nur das für die jeweilige Immunisierung verwandte Antigen sowie seine proteolytischen Fragmente erkannte (Abb. C.20 und C.28). Darüberhinaus unterschieden sich die tryptischen Peptidmuster der drei Proteine eindeutig voneinander (Abb. C.30) und es wurden individuelle mRNAs für die drei Proteine nachgewiesen. (Rosa et al., 1985b, Falkensammer et al., 1985b). Da die Aminosäuresequenzen von Sekretogranin I und Chromogranin A, die durch Klonierung und cDNA-Sequenzierung abgeleitet wurden, nur ein kurzes homologes Segment enthalten (Benedum et al., Manuskript in Vorbereitung), stellen die drei Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit unabhängige Genprodukte dar, sind also nicht durch alternatives Splicing von einem mRNA-Vorläufer abgeleitet. Das komplementäre Vorkommen der drei Proteine in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen (s. Abb. C.32 und C.33) ist demnach auf zellspezifische Expression unterschiedlicher Gene zurückzuführen.

Trotz distinkter Aminosäuresequenzen scheinen Sekretogranin I und II einige wenige homologe Sequenzen zu besitzen (P. Rosa, unveröffentlicht), wodurch die Kreuzreaktivität einzelner Antiseren erklärt werden könnte (vgl. Abb. C.30).

C.2.3.5.2 Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A, eine Familie verwandter Proteine

Obwohl Sekretogranin I, Sekretogranin II und Chromogranin A drei distinkte Proteine darstellen, besitzen sie doch eine Reihe gemeinsamer Merkmale, die eine gemeinsame Funktion aller drei

Proteine nahelegen.

- Erstens sind alle drei Proteine sehr sauer mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,2 und 5,2. Sie sind nicht nur reich an sauren Aminosäuren (Rosa et al., 1985b), sondern werden zusätzlich durch die posttranslationale Addition stark saurer Sulfat- und Phosphatgruppen modifiziert (Abb. C.10 und Rosa et al., 1985b). Die proteolytischen Fragmente der drei Proteine haben isoelektrische Punkte, die denen des jeweiligen Vorläufers sehr ähnlich sind, als ob die negativen Ladungen gleichmäßig über das ganze Molekül verteilt seien.

- Zweitens sind alle drei Proteine sekretorisch. Sie werden spezifisch in sekretorische Granula des regulierten Wegs sortiert und nach Stimulation sezerniert (Abschnitt C.2.2.4.2 und Rosa et al., 1985b).

- Drittens kommen Sekretogranin I und II wie Chromogranin A (Lloyd und Wilson, 1983; O'Connor et al., 1983) in einer Vielzahl endokriner und neuronaler Zelltypen vor, die Peptide auf dem regulierten Weg sezernieren (Abschnitt C.2.2.6 und Tabelle C.8). Das Vorkommen dieser Proteine überlappt sich in den meisten der untersuchten Fälle. In einigen Fällen wurde aber auch eine komplementäre Verteilung beobachtet (Abb. C.31 und 32). Die Verteilung der Proteinfamilie ist also ausgedehnter als die jedes einzelnen der drei Proteine. Die Proteine wurden weder in endokrinen Zellen, die Peptide konstitutiv sezernieren (z.B. Neuroglia) noch in exokrin sezernierenden Zellen gefunden (z.B. Speicheldrüse, exokrine Zellen von Duodenum und Pankreas, Rosa et al., 1985b).

Tabelle C.8: Vorkommen der Sekretogranine in endokrin sezernierenden Zelltypen. (Nach Rosa et al., 1985a und b, Rosa unveröffentlicht und Rindi et al., 1986).

Gewebe	Zelltyp	Peptidhormon	SGI	SGII	CGA
Adenohypophyse	gonadotroph	FSH	+	+	+
	thyrotroph	TSH	+	+	+
	mammotroph	LTH	+	+	+
	corticotroph	ACTH	+	+	+
	somatotroph	STH	-	-	-
Nebenschilddrüse		Parathyroidhormon	-	+	+
Pankreas	A-Zellen	Glucagon	+	+	+
	B-Zellen	Insulin	-	-	+
Schilddrüse	Follikelzellen	Thyroxin	-	-	-
	Parafollikelzellen	Calcitonin	-	+	+

SGI (II): Sekretogranin I (II), CGA: Chromogranin A, FSH: Follikel stimulierendes Hormon, TSH: Thyreoidea stimulierendes Hormon, LTH: Luteotropes Hormon, ACTH: Adenocorticotropes Hormon, STH: somatotropes Hormon.

C.2.3.5.3 Mögliche Funktionen der Sekretogranine und von Chromogranin A

Vorschläge für die - bisher nicht geklärte - Funktion der Sekretogranine und von Chromogranin A basieren auf der weiten Verbreitung dieser Proteine in einer Vielzahl von Zelltypen, die alle ein gemeinsames Merkmal besitzen: Sie sezernieren Peptide endokrin auf dem regulierten Weg. Die Sekretogranine bzw. Chromogranin A könnten z.B. eine Funktion als Vorläufer regulatorischer Proteine oder als Bindungsproteine für andere regulatorische Peptide besitzen. Andererseits könnten die drei Proteine eine Rolle beim Vorgang der Sekretion von Peptidhormonen spielen: denkbar wäre, daß sie als Helferproteine die Verpackung von Peptiden in sekretorische Granula vermitteln. Letzteres - obwohl bisher nicht bewiesen - scheint eine attraktive Hypothese zu sein: Die starke negative Ladung der Sekretogranine und von Chromogranin A, könnte die Bindung und damit Kondensation basischer Peptide bewirken. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits für die ebenfalls sauren Proteoglykane sekretorischer Granula aufgestellt (Farquhar und Palade, 1981; Zanini et al., 1980). Eine Beziehung zwischen diesen Proteoglykanen und Chromogranin A wurde durch die Identifizierung eines sulfatierten Glykoproteins in Nebennierenmarkszellen als stark sulfatierte Variante von Chromogranin A hergestellt (offener Pfeil mit Stern in Abb. C.28 und 30, Rosa et al., 1985b). Dieses sulfatierte Glykoprotein (p92) scheint nicht nur mit Chromogranin A sondern auch mit den sauren Proteoglykanen verwandt zu sein, denn es wird ebenso wie Proteoglykane durch Chondroitinase ABC hydrolysiert

(Falkensammer et al., 1985a).

Für die Überprüfung dieser Hypothese erscheint es wichtig, den genauen Mechanismus der Sekretion und Sortierung der Sekretogranine bzw. von Chromogranin A zu untersuchen. Es stellt sich die Frage, ob im Golgi-Apparat Rezeptoren existieren, die spezifisch die Sekretogranine bzw. Chromogranin A in sekretorische Vesikel des regulierten Wegs leiten, und ob die Sekretogranine bzw. Chromogranin A Komplexe mit den Peptidhormonen bilden, die in denselben Vesikeln konzentriert werden. In diesem Zusammenhang kann die Bindung der Sekretogranine an Membranproteine untersucht werden, z.B. durch Immunoblot-Technik (Gershoni und Palade 1983). Auf elektronenmikroskopischer Ebene ist zu klären, ob die Sekretogranine im trans-Golgi-Apparat, also an der Stelle, an der sekretorische Proteine von den übrigen Proteinen des Golgi-Apparats getrennt werden (Griffith und Simons, 1986), bevorzugt membranassoziiert sind. Eine solche Membranassoziation der Sekretogranine im trans-Golgi-Apparat ließe auf die Existenz spezifischer Rezeptoren zur Sortierung der Sekretogranine schließen. Weiterhin könnte nach Klonierung der Sekretogranine die Expression der Sekretogranine in Zellkulturen durch eine "Anti-Sense-mRNA" inhibiert werden (Izant und Weintraub, 1984; Laporte, 1984). Dadurch ließe sich feststellen, ob die Sekretogranine Helferproteine für die Hormonsekretion darstellen, bei deren Abwesenheit bestimmte Peptidhormone fehlgeleitet, d.h. entweder konstitutiv sezerniert oder im Golgi-Apparat akkumuliert werden. Diese Fragen sind Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserem Labor.

C.3 Zellbiologische Untersuchungen zur Sekretion und intrazellulären Lokalisation tyrosinsulfatierter Proteine in Gewebekulturen

C.3.1 Fragestellung

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, bei welchen Proteinklassen - außer bei den sekretorischen Proteinen - die Tyrosinsulfatierung auftritt. Dazu wurden Zellkulturen mit (^{35}S)-Sulfat markiert und der Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalt der in das Medium sezernierten Proteine sowie verschiedener subzellulärer Proteinfractionen untersucht. Es wurden folgende Zelllinien verwendet: menschliche Hepatomzellen (HepG2), menschliche Hautfibroblasten (nicht transformiert) und transformierte Mausfibroblasten (Ltk⁻), drei konstitutiv sezernierende Zelllinien, sowie Rattenphäochromozytomzellen (PC12) und Maushypophysentumorzellen (AtT20), die zusätzlich zur konstitutiven Sekretion Proteine in sekretorischen Granula speichern und diese erst nach Stimulation sezernieren (regulierte Sekretion) (s. Abschnitt A.3.2 und Tabelle A.2).

Ausgehend von der Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase, die bisher nur im Golgi-Apparat nachgewiesen wurde (s. Abschnitt A.4.2), von der sekretorischen Natur aller bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine (Tabelle A.4) und der Abundanz tyrosinsulfatierter Proteine im Blutplasma (s. Abschnitt C.1) wurden bei der Fragestellung folgende Schwerpunkte gesetzt:

1) Ist die Tyrosinsulfatierung eine Modifikation, die ausschließlich oder zumindestens überwiegend in sekretorischen Proteinen vorkommt?

Dazu wurde der Tyrosinsulfatgehalt der konstitutiv in das Zellkulturmedium sezernierten Proteine mit dem Tyrosinsulfatgehalt der zellassoziierten Proteine verglichen (Abschnitt C.3.2.1). Bei den reguliert sezernierenden Zellen mußten für die Bilanz zusätzlich die intrazellulär gespeicherten sekretorischen Proteine berücksichtigt werden.

Die Bilanz zeigte bei allen untersuchten Zelltypen, daß der überwiegende Teil der tyrosinsulfatierten Proteine sekretorisch war, daß jedoch ein kleiner - aber signifikanter - Anteil tyrosinsulfatierter Proteine mit den Zellen assoziiert blieb. Daraus ergab sich für den zweiten Teil des Kapitels folgende Fragestellung:

2) Wo sind die mit den Zellen assoziierten tyrosinsulfatierten Proteine lokalisiert?

Die am besten charakterisierten Zellkompartimente, die sich vom Golgi-Apparat ableiten und dementsprechend tyrosinsulfatierte Proteine enthalten könnten, sind Plasmamembran und Lysosomen (Abb. A.1). Die Untersuchung der Plasmamembranproteine wurde zusammen mit den übrigen Zellmembranen durchgeführt: bei verschiedenen Zelllinien wurden integrale Membranproteine angereichert und auf ihren Tyrosinsulfatgehalt hin untersucht (Abschnitt C.3.2.2).

Ob tyrosinsulfatierte Proteine in Lysosomen vorhanden sind, wurde durch Zellfraktionierung menschlicher Hautfibroblasten untersucht

(Abschnitt C.3.2.3).

Bei den Zellfraktionierungsexperimenten wurde ein tyrosinsulfatiertes Protein mit apparentem Molekulargewicht von 45 kD beschrieben, das löslich, aber in einem membranumschlossenen Zellkompartiment lokalisiert war. Das Protein wurde nicht sezerniert und war in Lysosomen nicht nachweisbar. Die Lokalisation dieses Proteins wurde durch Immuncytochemie charakterisiert (Abschnitt C.3.2.4).

C.3.2 Ergebnisse

C.3.2.1 Bilanz der Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats aus Zellkulturen

C.3.2.1.1 Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats in Puls-Chase-Experimenten

HepG2-Zellen wurden im Puls-Chase-Versuch mit (^{35}S)-Sulfat markiert und menschliche Hautfibroblasten wurden mit (^3H)-Tyrosin und (^{35}S)-Sulfat doppelmarkiert. Um während der Chase-Zeit die Endocytose radioaktiv markierter Proteine so gering wie möglich zu halten, wurde das Chase-Medium häufig gewechselt (s. Abb. C.34A, B). In den Proteinen, die in das Kulturmedium sezerniert worden waren, und in den Proteinen des Zellhomogenats nach Ende der Chase-Periode wurden (^3H)-Tyrosin- und (^{35}S)-Sulfateinbau bzw. der Anteil des an Tyrosin oder Kohlenhydrate gebundenen (^{35}S)-Sulfats quantifiziert.

Die Sekretion des proteingebundenen Tyrosins zeigte einen langsamen Verlauf im Vergleich zur Sekretion proteingebundenen

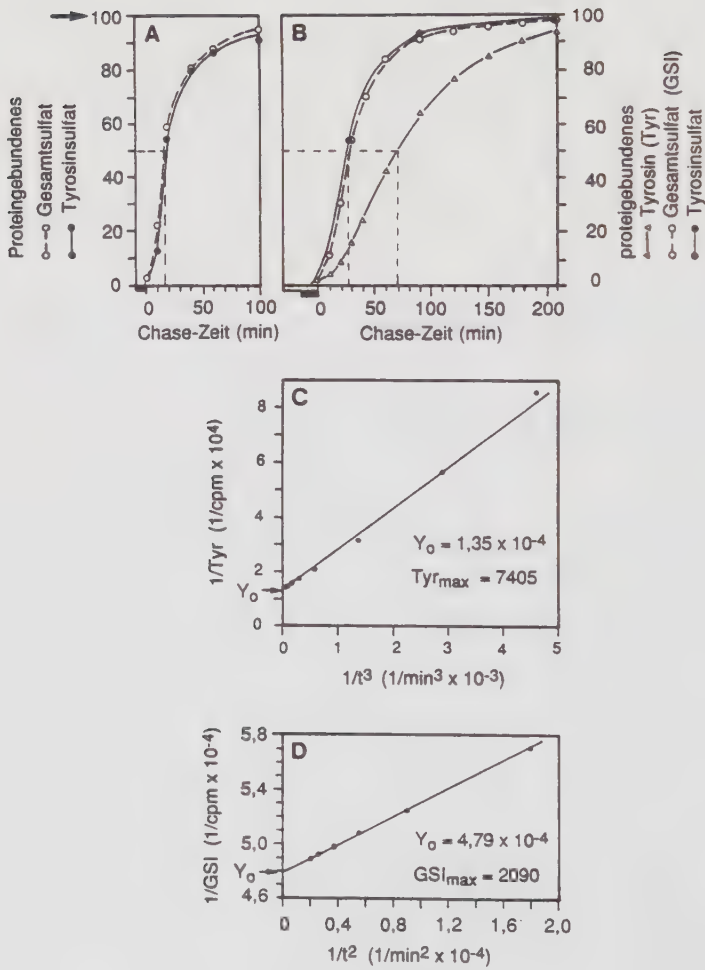
Abb. C.34: Zeitverlauf der Sekretion von proteingebundenem (^3H)-Tyrosin- und (^{35}S)-Sulfat aus Zellkulturen.

HepG2-Zellen (A) wurden mit (^{35}S)-Sulfat pulsmarkiert (10 min, 0,5 mCi/ml) und menschliche Hautfibroblasten (B-D) wurden mit (^3H)-Tyrosin und mit (^{35}S)-Sulfat doppelt pulsmarkiert (30 min, 0,3 mCi/ml (^3H)-Tyrosin und 15 min, 0,8 mCi/ml (^{35}S)-Sulfat; die Markierungsdauer wurde so lang wie nötig und so kurz wie möglich gewählt, um bei größtmöglichem Einbau von Radioaktivität auszuschließen, daß während der Markierungszeit signifikante Mengen markierter Proteine in das Medium sezerniert und ein Teil davon endocytisiert wurde. Dabei war zu beachten, daß tyrosinmarkierte Proteine nach Einbau der radioaktiven Aminosäure das ER und den Golgi-Apparat durchlaufen müssen und dementsprechend mit einer lag-Phase von 30- bis 40 Minuten sezerniert werden, während sulfatierte Proteine ihre Markierung im trans-Golgi-Apparat, d.h. kurz vor der Sekretion erhalten und bereits 10- bis 15 Minuten danach im Medium erscheinen (vgl. Tabelle A.3)). Der offene- bzw. die geschlossenen Balken zeigen die Dauer der Pulsmarkierung mit Tyrosin bzw. Sulfat. Während der anschließenden Chase-Periode wurde das Medium in Abständen von 10-30 min gewechselt. Die in das Medium sezernierten Proteine jeder Chase-Periode wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, um freies Tyrosin und Sulfat zu entfernen, und der Einbau von (^3H)-Tyrosin (Tyr) und Gesamt-(^{35}S)-Sulfat (GSI) in die Makromoleküle der gesamten Gelspur bestimmt. Für die Quantifizierung des proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats (TOS) (Methoden B.9.2.2) wurden die während der Chase-Perioden von 0-30 min, 30-90 min und 90-210 min aus Fibroblasten sezernierten Proteine vereinigt. Aufgetragen sind die Summen der vom Start der Markierung bis zum jeweiligen Meßpunkt im Medium akkumulierten Radioaktivitätsmengen (relative Einheiten).

Das Plateau der Sekretion markierter Proteine (Pfeil an der linken Ordinate, 100 relative Einheiten) wurde wie folgt extrapoliert: Eine Linearisierung der Sekretionskurven wurde dadurch erreicht, daß in Anlehnung an die Methode zur Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten allosterischer Enzyme (Hill-Plot, s. Segel, 1975) der reziproke Wert des Tyrosin- bzw. Sulfateinbaus gegen $1/t^3$ bzw. $1/t^2$ aufgetragen wurde (gezeigt am Beispiel der Fibroblasten, C und D). Der reziproke Wert des Schnittpunkts mit der y-Achse ergab den maximalen Radioaktivitätseinbau in sekretorische Proteine (HepG2-Zellen: $\text{GSI}_{\max} = 21740$ cpm, $\text{TOS}_{\max} = 1420$ cpm; Fibroblasten: $\text{Tyr}_{\max} = 7405$ cpm, $\text{GSI}_{\max} = 2090$ cpm, $\text{TOS}_{\max} = 185$ cpm; da für die TOS-Analyse 5x mehr Material eingesetzt wurde, betrug der tatsächliche Meßwert für $\text{TOS}_{\max}$ 925 cpm).

Die Halbwertszeiten der Sekretion betrugen für proteingebundenes Tyrosin 70 min, für proteingebundenes Sulfat und Tyrosinsulfat jeweils 17 min (HepG2-Zellen) bzw. 27 min (Fibroblasten).

Abb. C.34



Sulfats (Abb. C.34B), wie aufgrund der zeitlichen Abfolge von Tyrosin- und Sulfateinbau in Proteine zu erwarten (s. Tabelle A.3). Die Sekretion des gesamten an Makromoleküle gebundenen Sulfats (GSI) und des proteingebundenen Tyrosinsulfats (TOS)^(*) zeigten einen nahezu identischen Zeitverlauf und erreichten nach 2 - 3 Stunden ein Plateau (Abb. C.34A, B). Das Plateau der Sekretion proteingebundener Radioaktivität wurde aus den sigmoidähnlichen Sekretionskurven extrapoliert (Details s. Legende zu Abb. 34C, D). Daraus ergab sich, daß Fibroblasten einen auffallend großen Teil des proteingebundenen Tyrosins sezernierten (50% der Tyrosingesamtinkorporation, Tabelle C.9), während HepG2-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen nur etwa

(*) : Begriffsdefinition für die Inkorporation von Radioaktivität:

- gesamtes an Makromoleküle gebundenes Sulfat (GSI): Gesamteinbau von (^{35}S)-Sulfat in acetoneprazipitierbare Makromoleküle (Proteine und Proteoglykane) aus Zellhomogenaten oder angereicherten Proteinfractionen;
- proteingebundenes Tyrosinsulfat (TOS): nach alkalischer Hydrolyse durch Dünnschichtelektrophorese nachgewiesenes Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in acetoneprazipitierbaren Proteinen aus Zellhomogenaten oder angereicherten Proteinfractionen;
- an Makromoleküle gebundenes Kohlenhydratsulfat (CHOS): an den Kohlenhydratteil von Makromolekülen (Glykoproteinen oder Proteoglykanen) gebundenes (^{35}S)-Sulfat, dessen chemische Bindung nicht näher analysiert wurde; errechnet aus der Differenz GSI-TOS.

Tabelle C.9: Bilanz der Sekretion proteingebundenen (^3H)-Tyrosins und (^{35}S)-Sulfats aus menschlichen Zellkulturen.

Menschliche Hautfibroblasten und HepG2-Zellen wurden mit (^3H)-Tyrosin und (^{35}S)-Sulfat pulsmarkiert und anschließend ein Chase durchgeführt wie im Detail in Abb. C.34 beschrieben. Die Makromoleküle der Markierungsmedien, der Chase-Medien und der Zellen nach Chase wurden mit Aceton präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und an Makromoleküle gebundenes (^3H)-Tyrosin, (^{35}S)-Sulfat (Gesamtinkorporation) und (^{35}S)-Tyrosinsulfat quantifiziert (Methoden B.9.2.2). Die Menge des an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats wurde berechnet aus der Differenz von an Makromoleküle gebundenem Sulfat (Gesamtinkorporation) und Tyrosinsulfat. Das Plateau, d.h. der Maximalwert der Sekretion proteingebundener Radioaktivität wurde extrapoliert wie in Abb. C.34 beschrieben. Die Summe der in das Medium sezernierten und der zellassozierten proteingebundenen Tyrosin- bzw. Sulfatradioaktivität wurde jeweils auf 100% normiert. Dargestellt ist der Prozentsatz der in das Medium sezernierten (s) bzw. zellassozierten (z) proteingebundenen Radioaktivität. n.d.: nicht durchgeführt.

Zelllinie	Markierung	sekretorisch	zellassoziert	s/z
		(s) (%)	(z) (%)	
HepG2	(^3H)-Tyrosin	n.d.	n.d.	n.d.
	Tyrosin-(^{35}S)-sulfat	68,5	31,5	2,17
	Kohlenhydrat-(^{35}S)-sulfat	50	50	1,0
Fibroblasten	(^3H)-Tyrosin	50	50	1,0
	Tyrosin-(^{35}S)-sulfat	92,5	7,5	12,33
	Kohlenhydrat-(^{35}S)-sulfat	68,5	31,5	2,17

20% der proteingebundenen Aminosäuremarkierung sezernieren (Lodish und Kong, 1984). Daß es sich bei der hier beobachteten sehr hohen Freisetzung proteingebundenen Tyrosins aus Fibroblasten tatsächlich um Sekretion spezifischer Proteine handelte und nicht um Freisetzung cytoplasmatischer Proteine nach partieller Zellyse, zeigte der Vergleich der Proteinmuster nach Analyse durch SDS-PAGE: Medium und Zellhomogenat enthielten jeweils spezifische Proteinbanden (Abb. C.35).

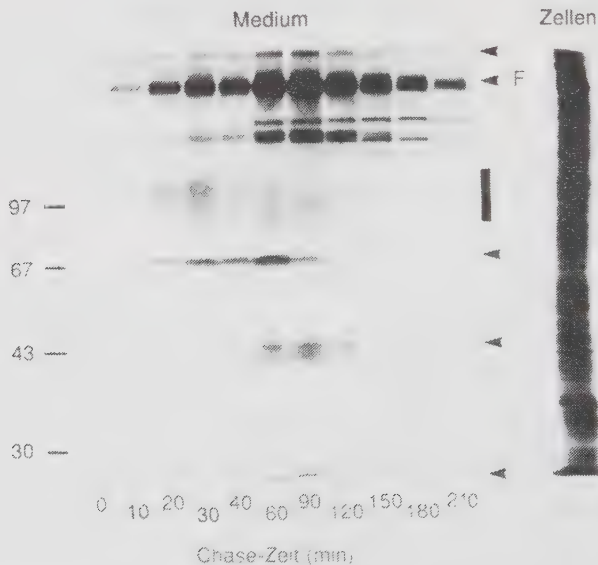
Bemerkenswert war, daß die Fibroblasten den überwiegenden Teil des an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats und besonders des proteingebundenen Tyrosinsulfats in das Kulturmedium sezernierten (Tabelle C.9). Ein Vergleich der Quotienten aus sezernierter und zellassoziierter proteingebundener Radioaktivität (s/z) ergab, daß Fibroblasten 12,3-mal mehr proteingebundenes Tyrosinsulfat als proteingebundenes Tyrosin sezernierten. Verglichen mit den gesamten zellassozierten Proteinen war Tyrosinsulfat also in sekretorischen Proteinen angereichert. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase im Golgi-Apparat (vgl. Abschnitt A.4.2.).

Da die zellassozierten Proteine eine Mischung verschiedener Proteinklassen darstellen (cytosolische Proteine und Proteine verschiedener Zellkompartimente), erlaubt die Gegenüberstellung von Tyrosinsulfat- und Tyrosineinbau keine Aussage darüber, ob proteingebundenes Tyrosinsulfat auch verglichen mit einzelnen Proteinklassen (z.B. Proteinen des Golgi-Apparats oder der Plasmamembran) in den sekretorischen Proteinen angereichert war. Um dies festzustellen, wurde die Sekretion proteingebundenen

Abb. C.35: Zeitverlauf der Sekretion (^3H)-tyrosinmarkierter Proteine aus Hautfibroblasten.

Menschliche Hautfibroblasten wurden mit (^3H)-Tyrosin und (^{35}S)-Sulfat pulsmarkiert, und während der anschließenden Chase-Periode wurde das Kulturmedium in Abständen von 10-30 min gewechselt wie in der Legende zu Abb. C.34 beschrieben. Gleiche Volumenanteile der Medien und der Zellen nach Chase wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Um zwischen (^3H)- und (^{35}S)-Radioaktivität zu unterscheiden, wurde ein unmittelbar nach dem Experiment exponiertes Fluorogramm (nicht gezeigt) mit dem abgebildeten, 28 Wochen später exponierten Fluorogramm verglichen. Zu diesem Zeitpunkt war die Sulfatradioaktivität auf 21% des Ausgangswerts abgefallen.

Balken: Sulfatierte Proteoglykane, Pfeilspitzen: mit Sulfat und Tyrosin markierte Proteine; die übrigen Banden waren überwiegend mit Tyrosin markiert. F: aufgrund des Molekulargewichts als Fibronectin identifizierte Proteinbande. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Die angegebenen Zeiten bezeichnen den Endpunkt des jeweiligen Zeitintervalls, an dem das Medium gesammelt wurde.



Tyrosinsulfats mit einer zweiten Proteinmodifikation, die im Golgi-Apparat stattfindet, verglichen: mit der Sekretion an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats. Der Vergleich der Quotienten s/z zeigte, daß in Fibroblasten und in HepG2-Zellen ein größerer Prozentsatz proteingebundenen Tyrosinsulfats als an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats sezerniert wurde (Tabelle C.9).

Je nach Zelltyp blieben unterschiedliche Mengen proteingebundenen Tyrosinsulfats mit den Zellen assoziiert (7,5 bzw. 31,5%). Die Möglichkeit, daß ein Teil dieser zellassozierten tyrosinsulfatierten Proteine extrazelluläre Matrixproteine, d.h. ebenfalls sekretorisch sind, wird in Abschnitt C.3.3.1 diskutiert werden.

C.3.2.1.2 Akkumulation proteingebundenen Tyrosinsulfats im Zellkulturmedium und in sekretorischen Granula bei Langzeitmarkierung

HepG2-, Ltk⁻-, AtT20- und PC12-Zellen wurden 18-24 Stunden lang mit (³⁵S)-Sulfat markiert und der (³⁵S)-Sulfat- sowie Tyrosin-(³⁵S)-Sulfatgehalt der sezernierten und der zellassozierten Proteine bestimmt.

Bei den konstitutiv sezernierenden Zelltypen (HepG2 und Ltk⁻) wurden während der Langzeitmarkierung 44-74,5% des an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats und 60-80% des proteingebundenen Tyrosin-(³⁵S)-sulfats in das Kulturmedium sezerniert (Tabelle C.10). Diese Werte stellen Minimalwerte für die Sekretion proteingebundenen Sulfats dar, denn am Ende der

Tabelle C.10: Akkumulation proteingebundenen Kohlenhydratsulfats und Tyrosinsulfats im Zellkulturmedium.

HepG2-, Ltk⁻-, AtT20- und PC12-Zellen wurden 18-24 Stunden mit (³⁵S)-Sulfat markiert (0,25 mCi/ml). Bei einem Experiment mit HepG2-Zellen wurde ein Chase von 100 min angeschlossen. Die Makromoleküle aus Medien und Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Pronase eluiert und an Makromoleküle gebundenes (³⁵S)-Sulfat (Gesamtinkorporation, GSI) bzw. Tyrosin-(³⁵S)-sulfat (TOS) quantifiziert (Methoden B.9.2.2). Die Werte für an Kohlenhydrat gebundenes Sulfat (CHOS) wurden aus der Differenz der Menge des gesamten an Makromoleküle gebundenen Sulfats und Tyrosinsulfats berechnet ($\text{cpm}_{\text{CHOS}} = \text{cpm}_{\text{GSI}} - \text{cpm}_{\text{TOS}}$). Die Summe von CHOS bzw. TOS in Medium und Zellen wurde jeweils auf 100% normiert.

Die in löslichen, konstitutiv sekretorischen Makromolekülen enthaltene Radioaktivität entspricht der im Zellkulturmedium akkumulierten an Makromoleküle gebundenen Radioaktivität. Bei PC12-Zellen wurde ein Mindestwert für die Radioaktivität, die in reguliert sekretorischen, intrazellulär gespeicherten Proteinen enthalten war, wie folgt bestimmt: die zellassozierten Makromoleküle wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Banden von Sekretogranin I und II ausgeschnitten und ihr Gehalt an (³⁵S)-Sulfat und (³⁵S)-Tyrosinsulfat quantifiziert. Die in die Sekretogranine inkorporierte Radioaktivität wurde von der in die zellassozierten Proteine inkorporierten Radioaktivität subtrahiert. Da PC12-Zellen möglicherweise noch weitere tyrosinsulfatierte, reguliert sekretorische Proteine enthielten, stellen die angegebenen Werte für regulierte Sekretion Minimalwerte (>) bzw. die für nicht-sekretorische zellassozierte Proteine Maximalwerte (<) dar.

K: konstitutive Sekretion, R: regulierte Sekretion, L: Langzeitmarkierung, Ch: Chase, n.d.: nicht durchgeführt.

Zelllinie	Sekretions- typ	Markierungs- Zeit	Markierung	sekretorisch (s)			zellassoziert (z) s/z	
				konstitutiv	reguliert	konst.+ reg.	(%)	
				(%)	(%)	(%)	(%)	
HepG2	K	L	TOS	65,5	-	-	34,5	1,9
			CHOS	44	-	-	56	0,79
	L + Ch		TOS	75,5 + 3	-	-	21,5	3,65
			CHOS	60,5 + 4,5	-	-	35	1,86
Ltk ⁻	K	L	TOS	80	-	-	20	4
			CHOS	53,5	-	-	46,5	1,15
AtT20	K + R	L	TOS	61	n.d.	n.d.	<39 (+)	>1,56
			CHOS	56,5	n.d.	n.d.	<43,5 (+)	>1,3
PC12	K + R	L	TOS	38	>31	>69	<31 (§)	>2,23
			CHOS	74,5	>9	>83,5	<16,5 (§)	>5,06

(+): einschließlich der reguliert sekretorischen Proteine

(§): nach Subtraktion der reguliert sekretorischen Proteine Sekretogranin I und II

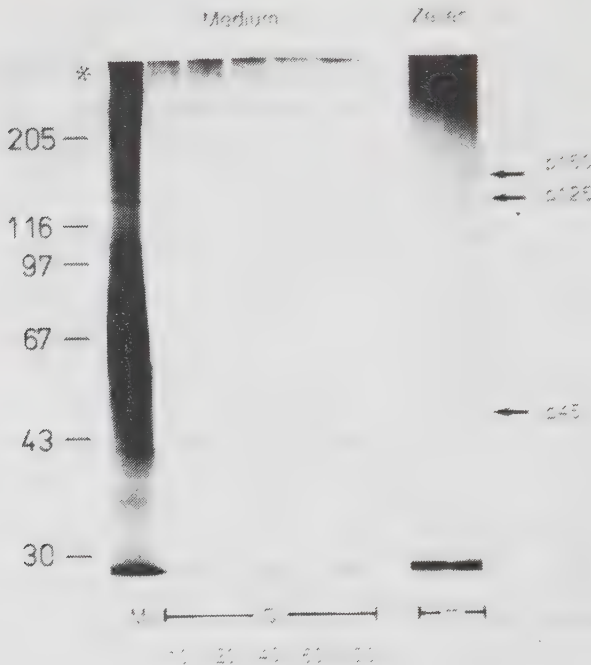
Langzeitmarkierung enthalten die Zellen im Golgi-Apparat und in sekretorischen Transportvesikeln für die Sekretion bestimmte sulfatierte Proteine. Die Menge dieser auf dem Weg zur Zelloberfläche befindlichen sekretorischen Proteine war jedoch gering im Vergleich mit den bereits sezernierten Proteinen, wie folgender Versuch zeigte: HepG2-Zellen wurden 18 Stunden mit (^{35}S)-Sulfat markiert und anschließend ein Chase von 100 min durchgeführt. Am Ende der Chase-Periode waren im Zellhomogenat keine sulfatmarkierten sekretorischen Proteinbanden mehr nachweisbar (Abb. C.36). Die hochmolekularen zellassozierten sulfatierten Proteoglykane, die im SDS-Gel nicht von sekretorischen sulfatierten Proteoglykanen ähnlichen Molekulargewichts unterscheidbar waren (Stern in Abb. C.36), wurden nach 100 Minuten Chase nicht in das Medium sezerniert. Sie waren also entweder intrazellulär oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert. Während der Langzeitmarkierung waren 75,5% des proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats im Medium akkumuliert worden, und während der Chase-Periode erhöhte sich dieser Wert um 3% auf 78,5%. Demnach wurde die Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats bei der in Tabelle C.10 dargestellten Bilanz nur geringfügig unterschätzt.

Da bei der Markierung mit (^{35}S)-Sulfat die Bilanz der Sekretion tyrosinsulfatierter Proteine zugunsten von Proteinen mit hohen Biosynthese- bzw. niedrigen Degradationsraten verfälscht werden kann (vgl. Abschnitt C.1.3.2), wurden HepG2-Zellen mit (^3H)-Tyrosin markiert und der (^3H)-Tyrosin- sowie der (^3H)-Tyrosinsulfatgehalt sezernierter und zellassoziierter

Abb. C.36: Sekretion sulfatierter Proteine aus HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden 18 Stunden mit 0,5 mCi/ml (^{35}S)-Sulfat markiert und anschließend ein Chase durchgeführt. Das Chase-Medium wurde nach 10, 20, 40 und 60 min gewechselt. Gleiche Volumenanteile des Zellhomogenats (H) nach 100 min Chase, des Markierungsmediums (M) und der Chase-Medien (C10 - C100) wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach jeweils 5h Exposition. Die beiden Spuren des Homogenats stellen das gleiche Fluorogramm dar, die rechte Spur wurde mit stärkerem Kontrast gedruckt, um die sulfatierten Proteine besser aufzulösen.

Die Pfeile bezeichnen nicht sekretorische tyrosinsulfatierte Proteine, die in Abschnitt C.3.2.2 bzw. C.3.2.4 charakterisiert werden. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Die angegebenen Zeiten bezeichnen den Endpunkt des jeweiligen Zeitintervalls, an dem das Medium gesammelt wurde.



Proteine verglichen. Der Quotient aus (^3H)-Tyrosinsulfat und (^3H)-Tyrosin ist vom Proteinturnover unabhängig und gibt an, welcher Prozentsatz aller in einer Proteinfraction enthaltenen Tyrosinbestandteile sulfatiert ist ("Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung"). Bei den zellassozierten Proteinen von HepG2-Zellen waren 0,02% aller Tyrosinreste sulfatiert (Tabelle C.11, Homogenat), bei den sezernierten Proteinen lag dieser Wert mit 0,4% 20-fach höher (Tabelle C.11, Medium). Diese Ergebnisse waren konsistent mit den oben beschriebenen Puls-Chase-Experimenten, und daher mit der überwiegenden, wenn nicht ausschließlichen Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotransferase im Golgi-Apparat.

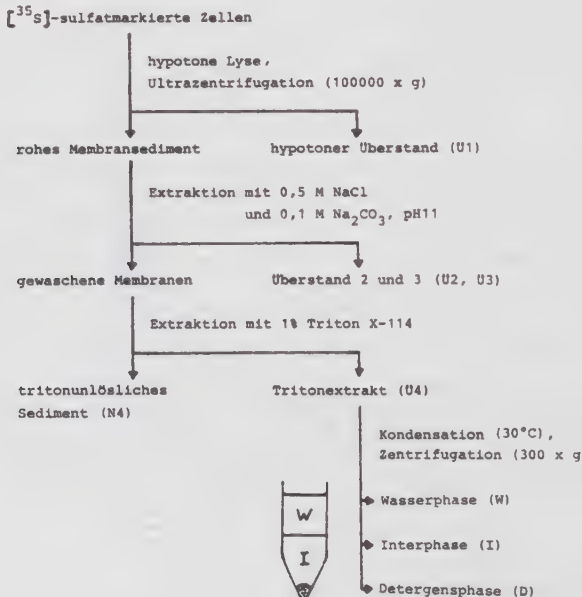
Bei AtT-20- und PC12-Zellen, die Proteine in sekretorischen Granula für die regulierte Sekretion speichern, war der Anteil des konstitutiv sezernierten proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats relativ gering (Tabelle C.10). Um auch die reguliert sekretorischen Proteine zu analysieren, mußten diese im Zellhomogenat identifiziert und quantifiziert werden, da bei der Stimulierung der regulierten Sekretion immer nur ein Bruchteil der sekretorischen Proteine in das Medium freigesetzt wird (vgl. Abschnitt C.2.2.4.2). Dies war nur für PC12-Zellen möglich, bei denen die Hauptproteine des regulierten Wegs bekannt sind (die Sekretogranine vgl. Abschnitt C.2). Die Proteine des PC12-Zellhomogenats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Banden von Sekretogranin I und II aus dem Gel ausgeschnitten und die Menge an (^{35}S)-Sulfat und Tyrosin-(^{35}S)-sulfat in den

Tabelle C.11: Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung in sekretorischen und zellassozierten Proteinen von HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden mit (^3H)-Tyrosin markiert (22,5 h, 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Die in das Markierungsmedium sezernierten Proteine und die Proteine des Zellhomogenats wurden durch Acetonpräzipitation und SDS-PAGE von freiem Tyrosin getrennt und eine Aminosäureanalyse durchgeführt, um den (^3H)-Tyrosin- und (^3H)-Tyrosinsulfatgehalt (TOS) zu bestimmen (Methoden B.9.2.3). Die gesamte (^3H)-Tyrosin-Inkorporation wurde berechnet als Summe der bei der Aminosäureanalyse gefundenen Mengen von (^3H)-Tyrosin und (^3H)-Tyrosinsulfat.

Probe	TOS	Tyrosin		TOS/Tyrosin
	(cpm)	unsulfatiert	gesamt	(%)
		(cpm)	(cpm)	
Medium	325	76690	77015	0,42
Homogenat	70	372485	372555	0,02

Abb. C.37: Arbeitsgang zur Anreicherung integraler Membranproteine. Bis auf die Detergenzkondensation wurden alle Schritte bei 40°C durchgeführt. (Einzelheiten der Methode s. B.8.1)



Sekretograninen und in den übrigen Proteinen quantifiziert. Die Sekretogranine stellten etwa 50% des proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats im Homogenat von PC12-Zellen (vgl. Abb. C.42). Ein Teil der übrigen tyrosinsulfatierten Proteine des Zellhomogenats, die noch nicht charakterisiert sind, könnte ebenfalls reguliert sekretorisch sein. Wenn nur die Sekretogranine berücksichtigt werden, muß also die Hälfte des zellassozierten proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats von PC12-Zellen den sekretorischen Proteinen zugerechnet werden. Demnach betrug die Summe des konstitutiv und reguliert sezernierten proteingebundenen Tyrosinsulfats mindestens 69% des insgesamt von PC12-Zellen synthetisierten proteingebundenen Tyrosinsulfats.

In allen untersuchten Zelltypen war also das proteingebundene Tyrosinsulfat zum überwiegenden Teil, aber nicht ausschließlich sekretorisch. Verglichen mit der Sekretion des an Makromoleküle gebundenen Kohlenhydratsulfats wurde bei HepG2- und Ltk⁻-Zellen ein größerer Prozentsatz des proteingebundenen Tyrosinsulfats sezerniert. Im Gegensatz dazu lag bei den PC12-Zellen, bei denen zwar ebenfalls der größere Teil des proteingebundenen Tyrosinsulfats sekretorisch war, der Quotient s/z für an Makromoleküle gebundenes Kohlenhydratsulfat höher als für proteingebundenes Tyrosinsulfat (Tabelle C.10).

C.3.2.2 Tyrosinsulfatierung integraler Membranproteine

C.3.2.2.1 Vergleich verschiedener Zelllinien

Um festzustellen, ob die Tyrosinsulfatierung auch bei Membranproteinen auftritt, wurden AtT20-, HepG2-, Ltk⁻- und PC12-Zellen

18-24 Stunden mit (^{35}S)-Sulfat markiert und die Membranproteine wie folgt angereichert (Übersicht s. Abb. C.37): Nach hypotoner Lyse der Zellen wurden die gesamten Zellmembranen durch Ultrazentrifugation von den löslichen Proteinen (Ü1) abgetrennt. Das Membransediment wurde mit Puffer hoher Ionenstärke (0,5 M NaCl) und anschließend mit pH 11 (0,1 M Natriumcarbonat) extrahiert, um Reste löslicher Proteine und die meisten peripheren Membranproteine, d.h. oberflächlich mit den Membranen assoziierte Proteine (vgl. Abb. A.2) zu entfernen. Dabei ist die Behandlung mit Natriumcarbonat besonders wirksam, da sie nicht nur ionische Wechselwirkungen von Proteinen mit der Membran löst sondern darüberhinaus Membranvesikel vollständig öffnet und deren löslichen Inhalt freisetzt (Fujiki et al., 1982). Die gewaschenen Membranen wurden mit Triton X-114 solubilisiert und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (N4). Um integrale Membranproteine, d.h. die Membran durchspannende Proteine (vgl. Abb. A.2) weiter anzureichern, wurde der niedrige Ausflockungspunkt des Triton X-114 ausgenutzt (Methode nach Bordier, 1981): Beim Erwärmen des Tritonextrakts (Ü4) auf 30°C aggregieren die Tritonmicellen, und durch Zentrifugation läßt sich eine Detergenzphase (D) von einer Wasserphase (W) trennen. Dabei verteilen sich die Proteine entsprechend ihrer Löslichkeit: Die hydrophilen, peripheren Membranproteine bleiben in der Wasserphase, während die hydrophoben, integralen Membranproteine in der Detergenzphase angereichert werden (*).

Um die Wirksamkeit der Proteinfractionierung zu verfolgen, wurden die Proteine aus den einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE analy-

siert. Die löslichen Fraktionen bzw. die Membranproteinfraktionen enthielten jeweils unterschiedliche Muster von Proteinen (Abb. C.38) und sulfatierten Makromolekülen (Abb. C.39). Entsprechend ihrer Löslichkeit befanden sich cytoplasmatische Proteine (z.B. Actin, dessen Filamente durch EDTA im hypotonen Puffer depolymerisiert worden waren; Pfeil A in Abb. C.38) und sekretorische Proteine (Sekretogranin I und II(**), Abb. C.39D) überwiegend im hypotonischen Überstand, ein Cytoskelettprotein (Tubulin, Pfeil T in Abb. C.38) dagegen im tritonunlöslichen Sediment.

Je nach Zelltyp waren 53-80% des zellassozierten, proteingebundenen Tyrosin-(³⁵S)-sulfats löslich oder peripher mit Membranen assoziiert (Ü1-3, ausgefüllte Balken in Abb. C.40).

(*): Als Kontrolle für die Wirksamkeit der Phasentrennung wurde die Verteilung eines bekannten Membranproteins und löslicher Proteine bei der Detergenzkondensation untersucht. Das "Contact site A-Protein" aus Dictyostelium (Stadler et al., 1982) wanderte - wie für das Membranprotein zu erwarten - ausschließlich in die Detergenzphase (nicht gezeigt). Umgekehrt blieben sämtliche löslichen, sulfatierten Proteine des hypotonen Überstands (Ü1) nach Zugabe von Triton und anschließender Kondensation in der Wasserphase (nicht gezeigt).

(**): Ein Teil der Sekretogranine wurde erst beim Waschen der Membranen bzw. durch Triton solubilisiert. Als hydrophile Proteine blieben sie jedoch bei der Detergenzkondensation in der Wasserphase (Abb. C.39D).

Abb. C.38: Anreicherung integraler Membranproteine aus HepG2-Zellen durch Detergenzkondensation.

HepG2-Zellen wurden wie in Abb. C.37 beschrieben fraktioniert, die Proteinfractionen durch SDS-PAGE analysiert und die Proteine durch Coomassie Blau-Färbung nachgewiesen. H: Homogenat, Abkürzungen der übrigen Proteinfractionen s. Abb. C.37; Pfeile: a = Aktin, t = Tubulin; Sterne kennzeichnen für die Wasserphase, Punkte für die Detergensphase spezifische Proteine. Von H, Ü1-Ü4 und N wurden jeweils gleiche Volumenanteile aufgetragen, von W, I und D 5x mehr Material. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben.

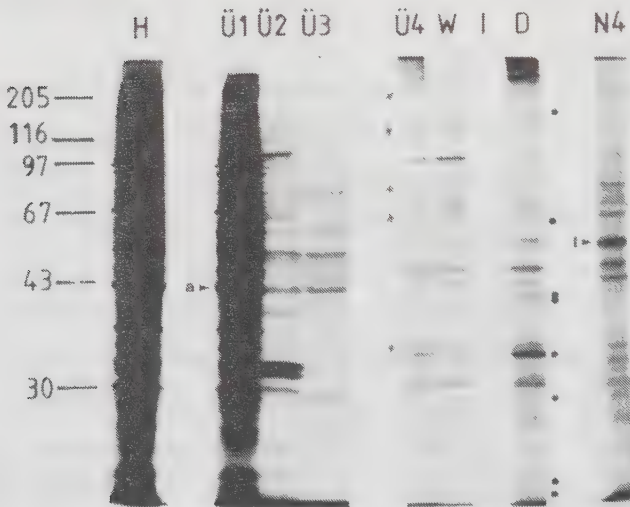


Abb. C.39: Muster des Sulfateinbaus in lösliche Proteine und Membranproteine.

(A): HepG2-, (B): LTK⁻, (C): AIT20- und (D): PC12-Zellen wurden in vivo 18-24 Stunden mit (³⁵S)-Sulfat markiert (0,25 mCi/ml) und lösliche und membrangebundene Proteine angereichert wie in Abb. C.37 beschrieben. Gleiche Volumenanteile der Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Um sulfatierte Proteoglykane abzutrennen und damit eine bessere Auflösung sulfatierter Proteinbanden zu erhalten wurden die Proteine der HepG2-Zellen vom SDS-Gel auf Nitrozellulose transferiert.

(a): Markierungsmedium, (b): Zellhomogenat, (c): Überstand 1 (hypotoner Überstand), (d): Überstand 2 (nach Extraktion mit 0,5 M NaCl) (e): Überstand 3 (nach Extraktion mit pH 11), (f): Detergenzextrakt, (g): Wasserphase, (h): Interphase, (i): Detergensphase, (k): tritonunlösliches Sediment. SGI, SGII: Sekretogranin I und II. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Um für alle Proteinfractionen vergleichbare Auflösung zu erzielen, wurden die abgebildeten Autoradiogramme unterschiedlich lang exponiert. Die relativen Expositionszeiten betrugen in (A): 1 (a-f,k) bzw. 3 (g-i); in (B): 1 (a), 5,8 (b-f,h,k) bzw. 29 (g,i); in (C): 1 (a), 21,5 (b-e), 54,5 (f,k) bzw. 380 (g,i); in (D): 1 (a), 10 (b), 20 (c,f,k), 100 (d,e) bzw. 160 (g,i).

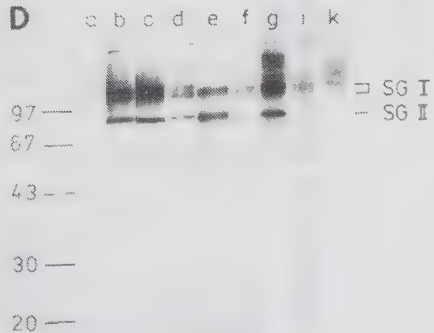
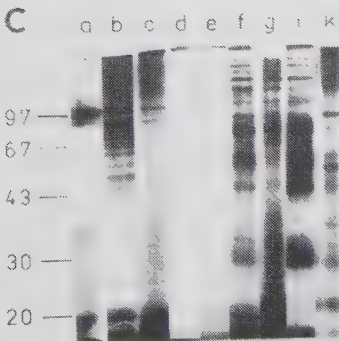
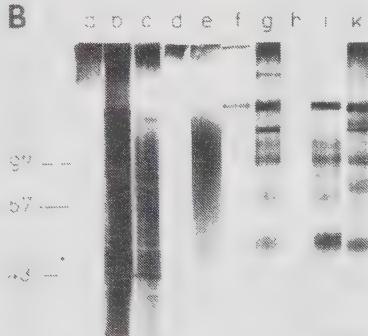
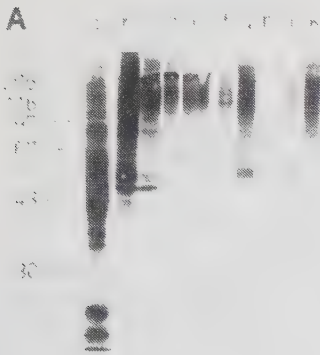
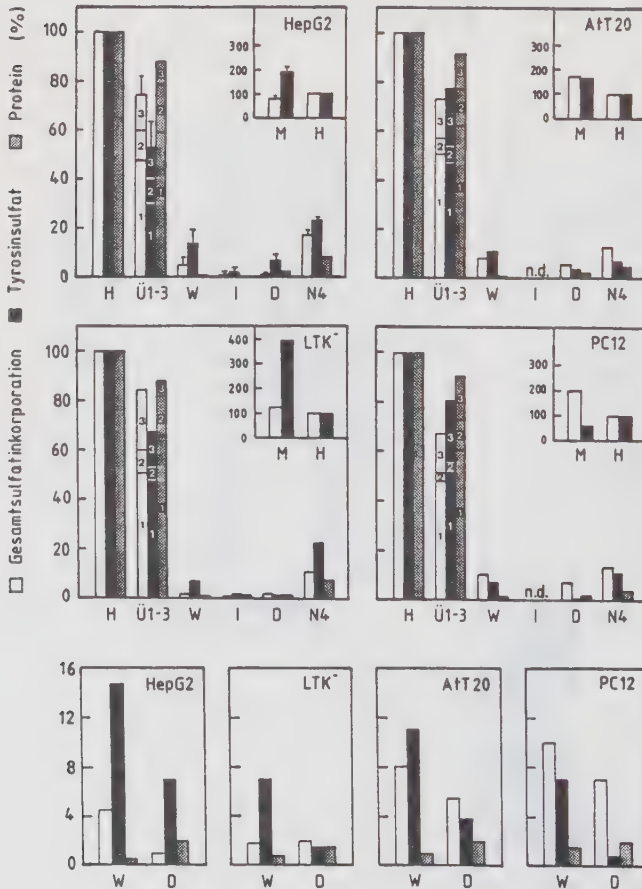


Abb. C.40: Tyrosinsulfatierung von löslichen Proteinen und Membranproteinen.

Die Zellen wurden wie in Abb. C.39 beschrieben *in vivo* mit (^{35}S) -Sulfat markiert und lösliche und membrangebundene Proteine angereichert. Die resultierenden Proteinfractionen wurden durch Acetonpräzipitation und SDS-PAGE von freiem Sulfat befreit und in den Proteinen der gesamten Gelspur Gesamt- (^{35}S) -sulfat- und Tyrosin- (^{35}S) -sulfatgehalt quantifiziert (s. Methoden, B.9.2.2). Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurden Aliquots der Proben mit Aceton gefällt. H: Homogenat, M: Markierungsmedium, Abkürzungen der übrigen Proteinfractionen s. Abb. C.37. U1, U2 und U3 wurden jeweils in einem Balken zusammengefasst; der untere-, mittlere- bzw. obere Teil des Balkens repräsentiert U1, U2 bzw. U3. Zur besseren Auflösung wurden in der unteren Reihe die Daten für die Wasser- und Detergenzphase in 5fach vergrößertem Maßstab gezeichnet. Die Fehlergrenzen bei HepG2-Zellen geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.



AtT20- und PC12-Zellen, die tyrosinsulfatierte reguliert sekretorische Proteine intrazellulär speichern (vgl. Abschnitt C.2.2.4 und Hille, unveröffentlicht), enthielten erwartungsgemäß mehr lösliches, proteingebundenes Tyrosinsulfat als die ausschließlich konstitutiv sezernierenden Zelltypen HepG2 und Ltk⁻.

Nur 9-23% des proteingebundenen Tyrosinsulfats waren nach Waschen der Membranen mit pH 11-Puffer membranassoziiert und mit Triton extrahierbar. Nach Detergenzkondensation befanden sich davon weniger als ein Drittel in der Detergenzphase, also weniger als 7% der Gesamtmenge im Homogenat (Abb. C.40, D). Auch bezogen auf die Proteinmenge war der Wert des proteingebundenen Tyrosinsulfats in der Detergenzphase niedriger als in der Wasserphase: Die Wasserphase enthielt je nach Zelltyp 7-14% des zellulären, proteingebundenen Tyrosinsulfats, aber nur 0,5-2% des Zellproteins, während die Detergenzphase nur 1,5-7% des proteingebundenen Tyrosinsulfats, aber 1,5-2,5% des Zellproteins enthielt.

Berücksichtigt man bei der Bilanz das während der Markierungszeit in das Medium sezernierte proteingebundene Tyrosinsulfat (vgl. Einsätze in Abb. C.40), so reduzieren sich die Werte für die Menge des proteingebundenen Tyrosinsulfats in der Detergenzphase auf 0,3-2,4% des gesamten, während der Markierung akkumulierten proteingebundenen Tyrosinsulfats. Diese Werte sind zwar gering, die gemessene (³⁵S)-Radioaktivität lag jedoch signifikant über dem Blindwert der Tyrosinsulfatanalyse und komigrierte bei zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese exakt mit unmarkiertem Tyrosinsulfatstandard (Abb. C.41).

zu Abb. C.40 : Ausbeute der Sulfatradioaktivität in den Fraktionen U1 bis P4:

	HepG2	Ltk ⁻	AtT20	PC12	
GSI	83,5	89	103,5	86	(% von H)
TOS	85,5	81	90,5	82	(% von H)

Abb. 41: Nachweis von Tyrosinsulfat in integralen Membranproteinen aus HepG2-Zellen.

Die integralen Membranproteine von (^{35}S)-sulfatmarkierten HepG2-Zellen wurden durch Detergenzkondensation angereichert wie in Abb. C.37 beschrieben und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine der gesamten Gelspur wurden mit Pronase eluiert, alkalisch hydrolysiert und die Aminosäuren durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt (s. Methoden B.9.2.2). A: Fluorogramm, B: Ninhydrinfärbung des beigemischten Tyrosinsulfatstandards. Der Startpunkt der Elektrophorese war rechts unten, die Pfeile geben die Laufrichtung bei pH1,9 bzw. pH3,5 an.

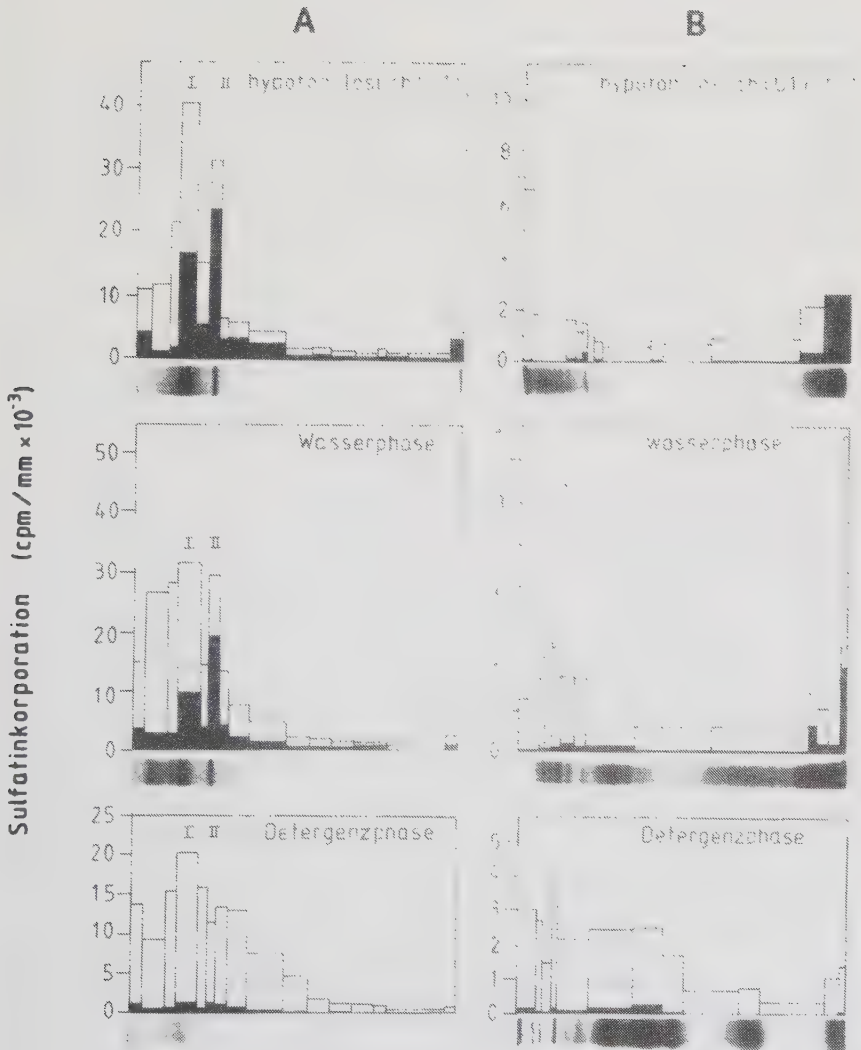
A

B

pH 1,9 →
↑ pH 3,5

Abb. C.42: Muster des (^{35}S)-Sulfat- und Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalts von löslichen- und membrangebundenen Proteinen in (a) PC12- und (b) AtT20-Zellen.

Die Zellen wurden wie in Abb. C.39 beschrieben in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert und lösliche und membrangebundene Proteine angereichert. Aliquots der hypoton löslichen- und der membrangebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Polyacrylamidgele wurden entsprechend der sulfatierten Banden zerschnitten und in den einzelnen Gelstücken der Gesamt-(^{35}S)-sulfatgehalt (Gesamtfläche der Säule über dem jeweiligen Gelstück) und der Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalt (ausgefüllte Fläche der Säule über dem Gelstück) bestimmt (s. Methoden, B.9.2.2). Um ungeachtet der unterschiedlichen Höhe der Sulfatinkorporation für alle Proben vergleichbare Nachweisempfindlichkeit zu gewährleisten, wurde für Wasser- und Detergenzphase fünfmal soviel Material eingesetzt wie für den hypotonen Überstand (bezogen jeweils auf die Volumenproportionen). Der Maßstab für die Auftragung der proteingebundenen Radioaktivität wurde so gewählt, daß die Gesamtfläche aller Säulen über der Gelspur für jede Probe gleich groß ist. Unter jedem Diagramm ist das zugehörige Autoradiogramm abgebildet (Elektrophoreserichtung von links nach rechts). I,II: Sekretogranin I und II.



Die mit integralen Membranproteinen angereicherten Detergenzphasen verschiedener Zelllinien enthielt also wenig, aber eindeutig nachweisbares proteingebundenes Tyrosinsulfat.

Bemerkenswert war die relativ hohe Menge proteingebundenen Tyrosinsulfats in der Detergenzphase der HepG2-Zellen (7% des gesamten, zellassozierten proteingebundenen Tyrosinsulfats). In diesem Zelltyp wurden für die Membranen spezifische tyrosinsulfatierte Proteine gefunden, die im folgenden Abschnitt charakterisiert werden (s. C.3.2.2.2).

Die Detergenzphase der Ltk⁻-Zellen, die sehr wenig proteingebundenes Tyrosinsulfat enthielt, wurde nicht weiter untersucht.

Um festzustellen, ob die Detergenzphasen der AtT20- und PC12-Zellen für die Membranen spezifische tyrosinsulfatierte Proteine enthalten, wurden die Proteine des hypotonischen, löslichen Überstands (Ü1), der Wasser- und der Detergenzphase jeweils durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden entsprechend der prominenten sulfatierten Banden zerschnitten und in den einzelnen Gelstücken an Makromoleküle gebundenes (³⁵S)-Sulfat und Tyrosin-(³⁵S)-sulfat quantifiziert. Bei den PC12-Zellen waren die Muster der tyrosinsulfatierten Proteine in allen drei Proteinfraktionen qualitativ sehr ähnlich (Abb. C.42A). Verglichen mit dem hypotonischen Überstand enthielt die Detergenzphase zwar quantitativ sehr wenig Sekretogranine, allerdings war proteingebundenes Tyrosin-(³⁵S)-Sulfat auch in dieser Fraktion jeweils genau in den Positionen von Sekretogranin I und II nachweisbar (Abb. C.42A, I

und II). Bei den AtT-20-Zellen enthielten die prominenten sulfatierten Banden der Detergenzphase in allen Molekulargewichtsbereichen nur sehr wenig Tyrosinsulfat. Es waren keine für die Detergenzphase spezifischen tyrosinsulfatierten Proteine nachweisbar. Demnach sind bei beiden Zelllinien die in der Detergenzphase nachgewiesenen tyrosinsulfatierten Proteine überwiegend kontaminierende lösliche Proteine.

C.3.2.2.2 Charakterisierung der tyrosinsulfatierten Membranproteine aus HepG2-Zellen

Die Proteine der Detergenzphase und der Wasserphase von HepG2-Zellen wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Beide Phasen enthielten tyrosinsulfatierte Proteine, die in den löslichen Fraktionen und im Markierungsmedium nicht vorkamen: Drei Proteine mit apparentem Molekulargewicht von 150 kD, 125 kD und 100 kD verteilten sich ungefähr im Verhältnis 1:1 zwischen Wasser- und Detergenzphase (Abb. C.43). Die Wasserphase enthielt zusätzlich ein Protein, das ein ähnliches Molekulargewicht wie p125 besaß, dessen isoelektrischer Punkt jedoch geringfügig weiter im Sauren lag (Stern in Abb C.43). Dieses Protein verhielt sich bei der Detergenzverteilung eindeutig hydrophil, ist also vermutlich ein peripheres Membranprotein. (Ob dieses Protein mit dem in beiden Phasen vorkommenden, weniger sauren Protein verwandt ist, z.B. aufgrund unterschiedlicher kovalenter Modifikation ein und desselben Vorläuferproteins, ist nicht bekannt). Im Folgenden werden die

Abb. C.43: Zweidimensionale Polyacrylamidgелеlektrophorese sulfatierter Membranproteine aus HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden in vivo mit (^{35}S) -Sulfat markiert und die Membranproteine angereichert wie in Abb. C.39 beschrieben. Gleiche Volumenanteile der Wasserphase (W) und der Detergenzphase (D) nach Tritonkondensation wurden mit Aceton präzipitiert, durch zweidimensionale PAGE aufgetrennt und sulfatmarkierte Proteine durch Fluorographie nachgewiesen. Gezeigt sind Teile des Fluorogramms vom oberen Rand des Gels bis zur Molekulargewichtsregion von 70kD. Der pH-Gradient reichte von pH3,5-7. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden p150, p125 und p100, die sich etwa im Verhältnis 1:1 in die Wasser- und Detergenzphase verteilten. Der Stern zeigt das Protein p125^W, das ausschließlich in der Wasserphase nachweisbar war. Unten: schematische Darstellung der Positionen der tyrosinsulfatierten Membranproteine.

basisch sauer

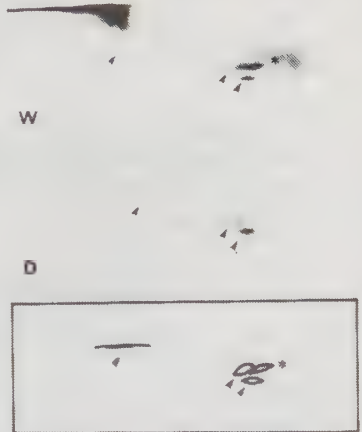


Tabelle C.12: Tyrosinsulfatanalyse der sulfatierten Membranproteine aus HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden mit (^{35}S) -Sulfat markiert, mit Trypsin behandelt (0,1 mg/ml in Ca-Mg-PBS, 90 min, 40°C), um sulfatierte Proteoglykane zu entfernen und die integralen Membranproteine durch Detergenzkondensation angereichert (s. Abb. C.37). Die sulfatierten Proteine und sulfatierte Proteoglykane (MW ca. 40-45 kD) aus der Detergenzphase wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese (vgl. Abb. C.43) gereinigt und einer Tyrosinsulfatanalyse unterzogen (s. Methoden, B.9.2.2). Tyrosinsulfat wurde durch pH3,5-Elektrophorese identifiziert. GSI: Gesamt- (^{35}S) -sulfat pro Analyseansatz, TOS: Tyrosin- (^{35}S) -sulfat nach alkalischer Hydrolyse.

Protein	GSI (cpm)	TOS (cpm)	TOS/GSI (%)
p100	1745	275	16
p125	740	100	13,5
p150	1605	335	21
Proteoglykan	10845	225	2

Proteine, die in beiden Phasen nachweisbar waren, als p150, p125 und p100 bezeichnet, das hydrophile Protein zur Unterscheidung mit p125^W.

P150, p125 und p100 enthielten 15-20% des eingebauten (³⁵S)-Sulfats als Tyrosinsulfat (Tabelle C.12).

Eine vollständige Charakterisierung konnte nur für p150 durchgeführt werden, da die Unterscheidung von p125 und p125^W aufgrund ihrer ähnlichen elektrophoretischen Mobilität schwierig war und p100 nicht in jedem Experiment nachweisbar war. Die Ursachen, warum p100 - trotz identischer Markierungsbedingungen - nicht in jedem Experiment mit (³⁵S)-Sulfat markiert wurde, konnten bisher nicht geklärt werden. Die Charakterisierung der drei tyrosinsulfatierten Membranproteine wurde zusätzlich dadurch erschwert, daß die verwendete HepG2-Zelllinie bereits wenige Passagen nach dem Auftauen der Stammzellen in zunehmenden Mengen sulfatierte Proteoglykane synthetisierte. Diese setzten bei der SDS-PAGE (³⁵S)-sulfatmarkierter Proteine als kontinuierliche Schwärzung die Auflösung der Autoradiogramme herab (s. Abb. C.40A). Die Proteoglykane konnten durch schonende Behandlung der Zellen mit Trypsin nach der Markierung entfernt werden. Das Verhalten der tyrosinsulfatierten Membranproteine bei der Detergenzkondensation wurde dadurch innerhalb der Versuchsgenauigkeit nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Bei bestimmten Experimenten, z.B. bei der Proteinasebehandlung ganzer Zellen, wurde die Trypsinbehandlung nicht angewendet, um Artefakte zu vermeiden (z.B. Veränderungen der Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran). In diesen Fällen

konnte durch Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose unter strikt kontrollierten Bedingungen (Verwendung frischen Transferpuffers, der noch nicht mit SDS und Salzen aus den Gelen angereichert war, Begrenzung der Transferzeiten auf 3 h) der größte Teil der Proteoglykane dadurch abgetrennt werden, daß sie langsamer transferierten als die Proteine.

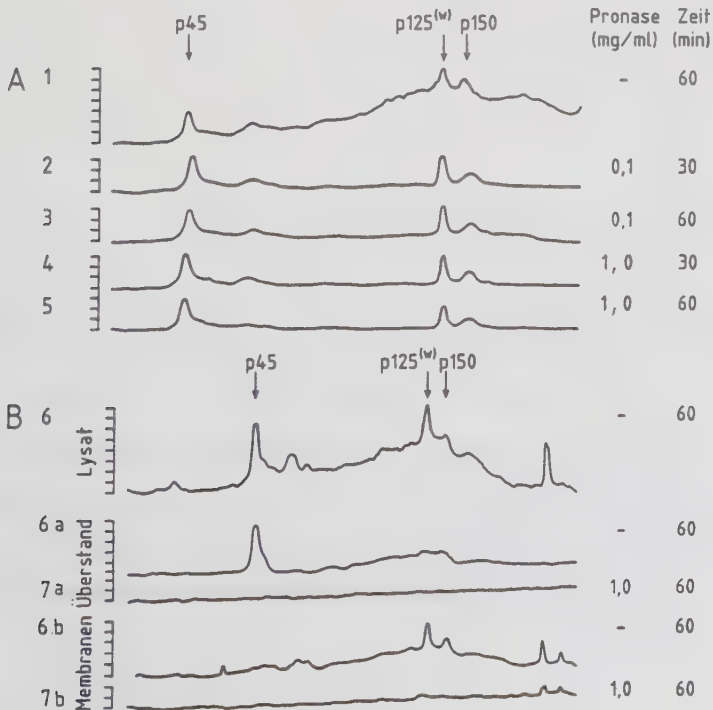
Die 1:1-Verteilung von p150, p125 und p100 wurde vom Verfahren der Membranpräparation nicht beeinflusst: wurde das Membransediment nach hypotoner Lyse ohne vorheriges Waschen mit Salz oder pH 11 unmittelbar mit Triton X-114 extrahiert, so zeigten die Proteine dieselbe 1:1-Verteilung in die beiden Phasen nach Detergenzkondensation (nicht gezeigt).

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei p150, p125 und p100 um eine homogene Population von Molekülen handelt, die sich aufgrund amphiphiler Eigenschaften entsprechend einem Gleichgewicht auf die beiden Phasen verteilten, oder ob die Wasser- und Detergenzphase jeweils Proteinvarianten mit unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften enthielten. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde nach einer ersten Kondensation die Detergenzphase auf 1% Triton X-114 verdünnt bzw. die Wasserphase mit frischem Triton X-114 versetzt und beide Phasen rekondensiert. Dabei verteilte sich p150 aus beiden Phasen jeweils wieder 1:1 in die zweite Wasser- und Detergenzphase (nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob die tyrosinsulfatierten Membranproteine in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurden intakte, sulfat-

Abb. C.44: Lokalisation tyrosinsulfatierter Membranproteine in intrazellulären Membranen von HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden 14 h mit (^{35}S)-Sulfat markiert und ein Chase von 5 Stunden angeschlossen, um sicherzustellen, daß neu synthetisierte Plasmamembranproteine die Zelloberfläche erreicht hatten. Intakte Zellen (1-5) bzw. durch hypotonen Schock und Ultraschall lysierte Zellen (6,7) wurden bei 37°C wie folgt inkubiert: (1) Kontrollzellen mit Ca-Mg-PBS, (2-5) Zellen + Pronase in Ca-Mg-PBS, (6) Kontrolllysat + 4faches Volumen Ca-Mg-PBS, (7) Lysat + 4faches Volumen Pronase in Ca-Mg-PBS. Die Konzentration der Pronase in der Inkubation und die Inkubationszeiten sind rechts angegeben. Die Inkubation wurde mit Rinderserumalbumin und PMSF gestoppt und die Zellen bzw. die lysierten Membranen sedimentiert (s. Methoden, B.3.5). Das gesamte Zellhomogenat (1-5), das Lysat (6) bzw. die löslichen Überstände (6a, 7a) bzw. Membranen (6b, 7b) wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Dargestellt ist die densitometrische Analyse der Fluorogramme (jeweils gleiche Empfindlichkeit). Laufrichtung der Elektrophorese: von rechts nach links; (1-5) und (6 und 7) waren auf zwei separaten Gelen gelaufen. p150, p125(w): tyrosinsulfatierte Membranproteine, p45: tyrosinsulfatiertes lösliches Protein (vgl. Abschnitt C.3.2.4).



markierte HepG2-Zellen mit Pronase und Proteinase K behandelt. Selbst unter drastischen Bedingungen (1mg/ml Protease, 60 min bei 37°C) wurde p150 nicht hydrolysiert (gezeigt für Pronase, Abb. C.44A). Daß dieses Ergebnis nicht durch außergewöhnliche Proteinaseresistenz des tyrosinsulfatierten Membranproteins verursacht war, zeigte folgende Kontrolle: die Zellen wurden hypoton lysiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen wie die intakten Zellen mit Proteinase inkubiert. Dabei wurde p150 fast vollständig hydrolysiert (Abb. C.44B). P150 zeigte also bei der Proteasebehandlung ganzer Zellen das gleiche Verhalten wie das tyrosinsulfatierte Protein p45, dessen Lokalisation innerhalb von Membranvesikeln in Abschnitt C.3.2.4 gezeigt wird.

Daß p150 nur nach hypotoner Lyse der Zellmembranen von den Proteasen degradiert wurde, ist ein starker Hinweis darauf, daß es intrazellulär lokalisiert ist.

C.3.2.3 Sulfatierung lysosomaler Proteine^(*)

Für die Untersuchung der Sulfatierung lysosomaler Proteine wurden

(*) : Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Prof. v. Figura (Münster) durchgeführt, in dessen Labor ich die Methode der Lysosomenpräparation lernte. Die Lysosomenpräparation aus Fibroblasten nach Langzeitmarkierung (Abb. C.46 und Tabelle C.13) und die in der Diskussion erwähnte Anreicherung lysosomaler Enzyme wurden von Dr. Bräulke in der Arbeitsgruppe von Prof. v. Figura durchgeführt.

menschliche Hautfibroblasten verwendet. Bei dieser Zelllinie sind die Bedingungen der Lysosomenpräparation besonders gut ausgearbeitet. Die Zellen wurden in vivo mit (^{35}S)-Sulfat markiert, isotonisch homogenisiert und ein postnukleärer Überstand (1000 x g-Überstand) hergestellt. Die Membranen des postnukleären Überstands wurden durch Percolldichtegradientenzentrifugation aufgetrennt wie im Detail in Abb. C.45A und im Methodenteil beschrieben (s. B.8.3). Der Percollgradient war so ausgelegt, daß sich die Lysosomen aufgrund ihrer hohen Dichte mit guter Ausbeute (68,5% der β -N-Acetylglucosaminidase-Aktivität) am unteren Ende des Gradienten befanden und deutlich von den übrigen, im oberen Viertel des Gradienten flotierenden Membranen abgetrennt waren. Diese obere Membranbande (= "leichte Membranen") enthielt sowohl ER, Golgi-Apparat als auch Plasmamembran, Mitochondrien etc., die unter den verwendeten Bedingungen nicht aufgetrennt wurden (Lemansky et al., 1984). Die Verteilung der in einem repräsentativen Gradienten gemessenen Leitenzyme zeigt Abb. C.45B. Die Kontamination der lysosomalen Fraktion mit Golgi-Membranen wurde durch Messung der β -Galaktosyltransferase, einem Leitenzym des Golgi-Apparats, bestimmt und betrug weniger als 1% der im gesamten Gradienten gemessenen β -Galactosyltransferaseaktivität. Die Lysosomen waren also gut von den Golgi-Membranen abgetrennt.

Die Wirksamkeit der Trennung von Lysosomen und Golgi-Apparat wurde durch die unterschiedlichen Muster der sulfatierten Proteine in beiden Fraktionen bestätigt. Nach Langzeitmarkierung der Fibroblasten mit (^{35}S)-Sulfat enthielten die leichten

Abb. C.45: (A): Arbeitsschema für die Präparation von Lysosomen durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.

(B): Dichteprofil des Percollgradienten und Verteilung je eines Leitenzyms von Lysosomen (β -N-Acetylglucosaminidase = Glucosaminidase) und Golgi-Apparat (β -Galactosyltransferase = Gal.-transferase). Die Balken unter dem Diagramm zeigen, welche Fraktionen als Lysosomen bzw. leichte Membranen zusammengefaßt wurden. Unten: Verteilung der Glucosaminidase und der Galactosyltransferase in den Lysosomen bzw. den leichten Membranen (angegeben als prozentualer Anteil der im gesamten Gradienten gemessenen Enzymaktivität).

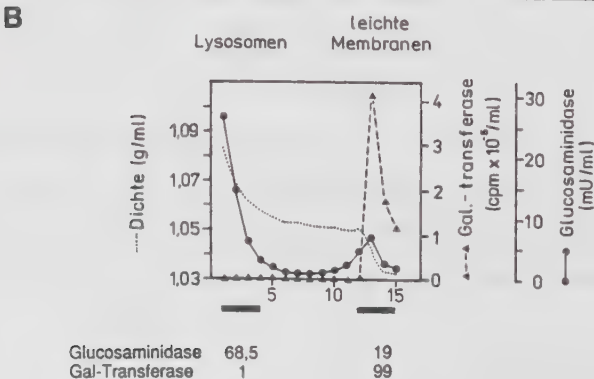
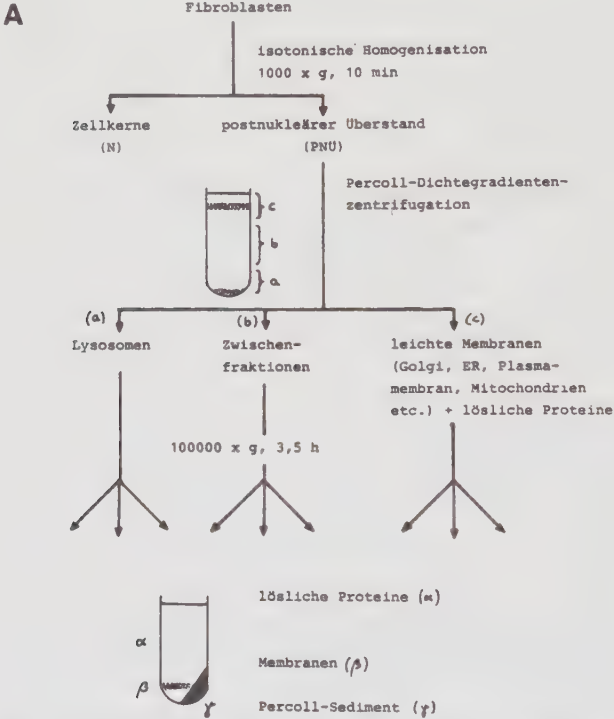


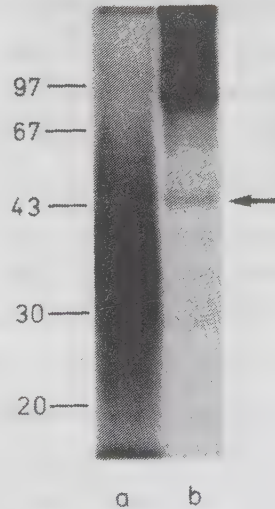
Tabelle C.13: Tyrosinsulfatgehalt der Proteine aus Lysosomen und leichten Membranen nach Langzeitmarkierung menschlicher Hautfibroblasten.

Lysosomen und leichte Membranen wurden aus sulfatmarkierten menschlichen Hautfibroblasten isoliert (Langzeitmarkierung des in Abb. C.46 beschriebenen Versuchs). Für beide Membranfraktionen wurde die Gesamtmenge des an acetonpräzipitierbare Makromoleküle gebundenen (^{35}S)-Sulfats (GSI) und Tyrosin-(^{35}S)-sulfats (TOS) quantifiziert (s. Methoden, B.9.2.2.). Σ : Summe der Radioaktivität in Lysosomen und leichten Membranen.

	Lysosomen		leichte Membranen		gesamt (Σ)
	(cpm)	(% von Σ)	(cpm)	(% von Σ)	(cpm)
GSI	$2,0 \times 10^6$	47,6	$2,2 \times 10^6$	52,3	$4,2 \times 10^6$
TOS	$0,16 \times 10^4$	5,5	$2,73 \times 10^4$	94,5	$2,89 \times 10^4$

Abb. C.46: Sulfatierung lysosomaler Proteine in menschlichen Hautfibroblasten.

Menschliche Hautfibroblasten wurden 17 h mit (^{35}S)-Sulfat markiert und Lysosomen sowie leichte Membranen durch Percoll-dichtegradientenzentrifugation isoliert (s. Abb. C.45A und Methoden, B.8.3). Die Proteine beider Fraktionen (gleiche Volumenanteile) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Abgebildet sind die Fluorogramme der Lysosomen (a) und leichten Membranen (b). Das tyrosinsulfatierte Protein p45 (Pfeil) wird in Abschnitt C.3.2.4 charakterisiert. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben.



Membranen im wesentlichen zwei sulfatierte Banden (MW ca. 85- bzw. 45 kD) (Abb. C.46b), die Lysosomen dagegen diffus über die Region von 25-40 kD verteilte sulfatierte Proteoglykane (Abb. C.46a). Sulfatierte Proteinbanden waren in den Lysosomen entweder nicht vorhanden oder durch die Proteoglykane maskiert.

Nach der Langzeitmarkierung hatten Lysosomen und leichte Membranen größenordnungsmäßig gleiche Mengen Sulfats in Makromoleküle inkorporiert (Tabelle C.13, GSI), während die Menge an proteingebundenem Tyrosin-(³⁵S)-sulfat in den Lysosomen nur etwa 1/15 des Werts in den leichten Membranen betrug.

Da während der Langzeitmarkierung in das Medium sezernierte tyrosin-(³⁵S)-sulfatierte Proteine endocytisiert und zum Abbau in die Lysosomen transportiert werden können, wurde die Tyrosinsulfatierung lysosomaler Proteine im vorigen Versuch möglicherweise überschätzt. Deshalb wurde zusätzlich eine Puls-Chase-Markierung durchgeführt, um den Zeitverlauf der Sulfatinkorporation in Lysosomen und leichte Membranen unter Bedingungen zu verfolgen, unter denen nur wenig Proteine endocytisiert werden. Die Dauer der Pulsmarkierung betrug 20 min, die Dauer der Chase-Periode 20- bis 100 min. Für jeden Zeitpunkt wurden die Lysosomen und leichten Membranen durch Percolldichtegradientenzentrifugation isoliert. Am Ende der Pulsmarkierung war die Sulfatradioaktivität fast ausschließlich in den leichten Membranen enthalten, und zwar genau in den Fraktionen, die auch β -Galaktosyltransferase-Aktivität, also Golgi-Membranen enthielten (Abb. C.47A, oben und Mitte). Nach der Chase-Periode nahm die Sulfatradioaktivität in den leichten Membranen ab(*),

etwa 80% davon wurden in das Medium sezerniert (vgl. Abb. C.47C) und etwa 20% davon in die Lysosomen transportiert (Abb. C.47A, unten und Abb. C.47C). Die Abnahme des proteingebundenen Gesamtsulfats in den leichten Membranen verlief spiegelbildlich zur Zunahme proteingebundenen Gesamtsulfats im Medium (Abb. C.47C). Bereits am Ende der 20-minütigen Pulsmarkierung war im Medium proteingebundenes Sulfat nachweisbar, nach 30 min Chase hatte die Sekretion des proteingebundenen Sulfats ein Plateau erreicht. Im Gegensatz dazu stieg die Sulfatinkorporation bei den Lysosomen erst nach 20 min Chase steil an und erreichte bei ca. 60 min Chase ein Maximum (Abb. C.47C). Die Analyse durch SDS-PAGE zeigte auch bei diesem Versuch, daß die Lysosomen überwiegend sulfatierte Proteoglykane enthielten. Es waren keine für die Lysosomen spezifischen Proteinbanden nachweisbar (Abb. C.47B).

Der Tyrosin-(^{35}S)-sulfatgehalt der Proteine in leichten Membranen und im Medium zeigte den gleichen Zeitverlauf wie der Gesamt-(^{35}S)-sulfatgehalt (Abb. C.47C, vgl. auch das Ergebnis des unabhängig durchgeführten Puls-Chase-Versuchs in Abb. C.34). Nach 40 min Chase waren 80-85% des proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats aus den Zellen sezerniert worden. Im Gegensatz zu den leichten Membranen lag in den Lysosomen die Menge des proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats während der

(*): Nach der Chase-Periode war das Maximum der restlichen Sulfatradioaktivität in den leichten Membranen um eine Fraktion nach rechts, also zu geringerer Dichte hin verschoben, was vermutlich auf Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran oder in andere Kompartimente zurückzuführen ist.

Abb. C.47: Tyrosinsulfatgehalt der Proteine aus Lysosomen, leichten Membranen und Medien nach Puls-Chase-Markierung menschlicher Hautfibroblasten.

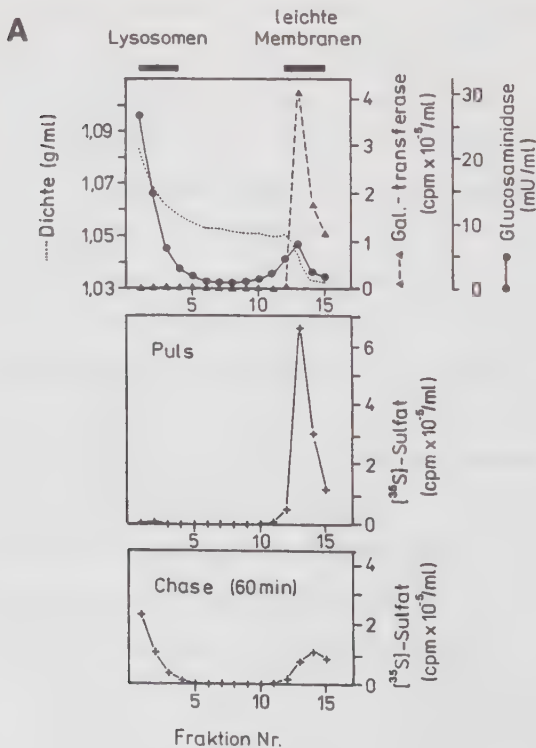
Menschliche Hautfibroblasten wurden 20 min mit (^{35}S)-Sulfat pulsmarkiert (0,5 mCi/ml) und ein Chase von 20-100 min durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden Lysosomen und leichte Membranen durch Percoll-dichtegradientenzentrifugation isoliert (s. Methoden, B.8.3 und Abb. C.45A).

(A) Verteilung der Sulfatradioaktivität im Percollgradienten.

Gleiche Volumenanteile der Percollfraktionen wurden zur Bestimmung der Sulfatradioaktivität eingesetzt (Mitte: nach 20 min Puls, unten: nach 100 min Chase). Zum Vergleich sind das Profil der Dichte und die Verteilung der Leitenzyme von Lysosomen (Glucosaminidase) bzw. des Golgi-Apparat (Gal.-transferase) aufgetragen (oben, vgl. Abb. C.45B).

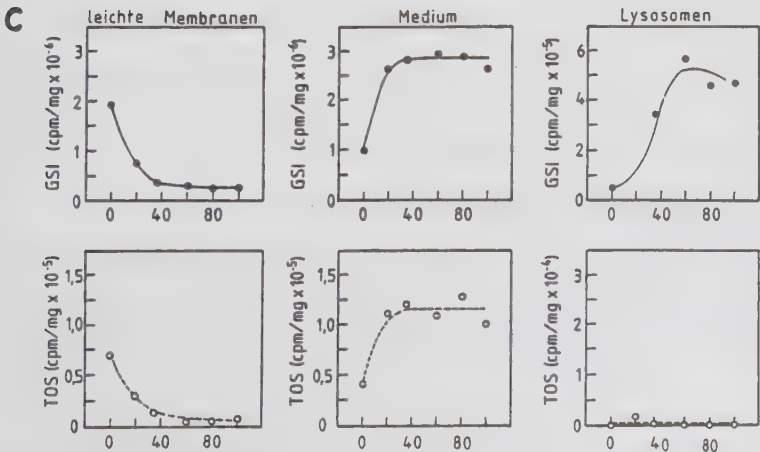
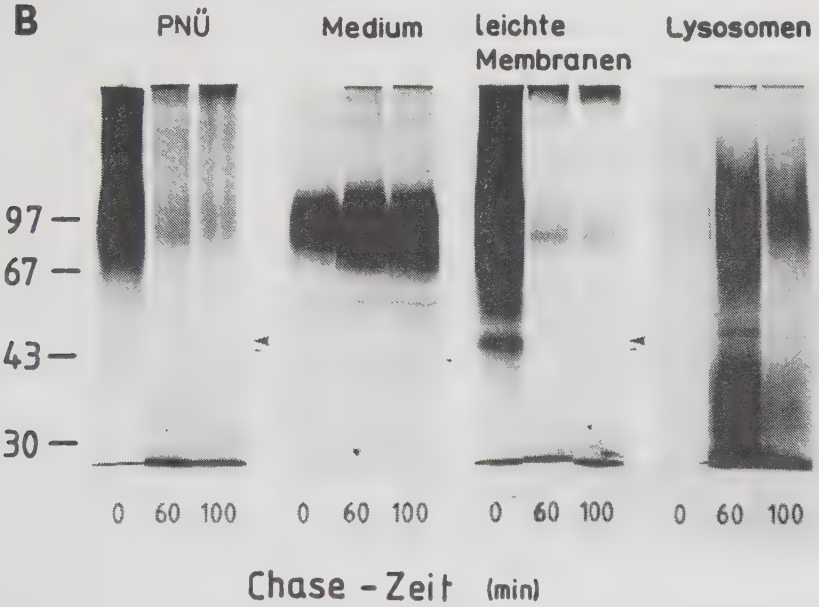
(B) Spezifische Muster der sulfatierten Proteine im postnukleären Überstand, in Medien, leichten Membranen und Lysosomen.

7,5% des PNU, 80% der leichten Membranen und Lysosomen und 8,3- bzw. 5,6% der Puls- bzw. Chase-Medien wurden durch SDS-PAGE analysiert und sulfatierte Proteine durch Fluorographie nachgewiesen. Dargestellt sind die Fluorogramme (jeweils gleiche Expositionszeiten). Pfeilspitzen: p45, tyrosinsulfatiertes zellassoziiertes Protein, das in Abschnitt C.3.2.4. charakterisiert wird; Pfeile: sekretorisches tyrosinsulfatiertes Protein. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben.



(C) Sulfat- und Tyrosinsulfatgehalt der Makromoleküle aus leichten Membranen, Medium und Lysosomen.

Die Makromoleküle wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. B), mit Pronase aus dem Polyacrylamidgel eluiert und an Makromoleküle gebundenes (^{35}S)-Sulfat (GSI) und Tyrosin-(^{35}S)-sulfat (TOS) quantifiziert (auf 1 mg Gesamtzellprotein bezogen). Die Werte für die Medien stellen jeweils die Summe des Markierungsmediums und des entsprechenden Chase-Mediums dar. Man beachte die unterschiedlichen Skalen für leichte Membranen und Medium einerseits und Lysosomen andererseits.



ganzen Versuchszeit an der unteren Nachweisgrenze. (Der nach 20 min Chase gemessene Wert lag mit 20 cpm nur wenig über dem Blindwert der Tyrosinsulfatanalyse; dieser Wert betrug ca. 1% der Gesamtmenge der intrazellulär und im Medium nachgewiesenen proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats. Bei der Puls-Chase-Markierung wurden also keine signifikanten Mengen proteingebundenen Tyrosin-(^{35}S)-sulfats in den Lysosomen festgestellt.

Innerhalb der Versuchsgenauigkeit war die Summe der tyrosinsulfatierten Proteine in Medium und leichten Membranen über die gesamte Versuchszeit hin konstant (Abb. C.47C), und die sulfatierten Proteinbanden, die nach der Pulsmarkierung im postnukleären Überstand bzw. in den leichten Membranen sichtbar waren, wurden nach der Chase-Periode entweder im Medium oder in den leichten Membranen wiedergefunden (Abb. C.47B). Der Hauptanteil des proteingebundenen Tyrosinsulfats wurde also im Medium oder intrazellulär akkumuliert und nicht degradiert. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Lysosomen eine im Vergleich mit dem Medium und den leichten Membranen kleine Menge tyrosinsulfatierter Proteine enthielten, die während der Aufarbeitung durch Hydrolasen degradiert oder desulfatiert wurden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Lysosomen hypoton lysiert und zusammen mit exogen zugesetzten tyrosinsulfatierten Proteinen (Sekretograninen) unter Bedingungen inkubiert, die den Versuchsbedingungen bei der Isolation der Lysosomenfraktion vergleichbar waren (3,5 Stunden, 4°C, mit und ohne Proteaseinhibitoren). Anschließende Analyse durch SDS-PAGE zeigte, daß das Molekulargewicht der Sekretogranine durch die

Tabelle C.14: Stabilität tyrosinsulfatierter Proteine im lysosomalen Lysat.

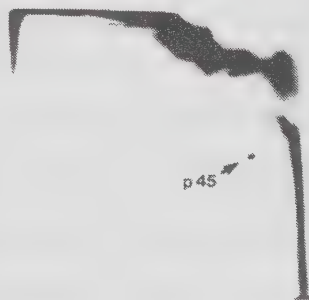
Lysosomen von menschlichen Hautfibroblasten wurden durch Percolldichtegradientenzentrifugation isoliert (s. Abb. C.45A) und hypoton lysiert (s. Methoden, B.8.4). Das Lysat wurde mit exogen zugesetzten (^{35}S)-sulfatmarkierten Sekretograninen 3,5 h bei 40°C mit oder ohne Proteaseinhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Sekretogranine durch SDS-PAGE analysiert und ihr Gehalt an (^{35}S)-Sulfat (GSI) und Tyrosin-(^{35}S)-sulfat (TOS) mit der Kontrolle (Inkubation ohne Lysosomen) verglichen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten. Die Arylsulfataseaktivität wurde in einem Aliquot vor und nach der Inkubation bestimmt. Die Ausgangsaktivität vor der Inkubation betrug 1,2 nmol/h. Die Inkubationen wurden in Triplikaten durchgeführt.

	Sekretogranin I		Sekretogranin II		Arylsulfatase A (nmol/h)
	GSI (cpm)	TOS (cpm)	GSI (cpm)	TOS (cpm)	
Kontrolle	6450 $\pm$ 250	6080 $\pm$ 450	2050 $\pm$ 170	1540 $\pm$ 230	
Lysosomen	5390 $\pm$ 500	4715 $\pm$ 800	2290 $\pm$ 150	1750 $\pm$ 210	1,05
Lysosomen + Inhibitoren	6890 $\pm$ 1000	5450 $\pm$ 400	2840 $\pm$ 300	2010 $\pm$ 180	0,95

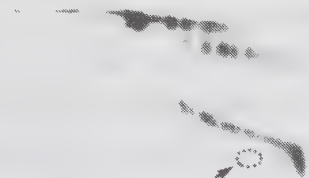
Abb. C.48: p45, ein nicht-sekretorisches, tyrosinsulfatiertes Protein.

HepG2-Zellen wurden 20 Stunden mit (^{35}S)-Sulfat markiert. 100 μg Zellprotein und die in ein entsprechendes Volumen des Markierungsmediums sezernierten Proteine wurden mit Aceton präzipitiert und durch 2D-PAGE und Fluorographie analysiert. Das Fluorogramm der sezernierten Proteine wurde doppelt so lang exponiert wie das der Zellproteine. Pfeile: p45; im Fluorogramm der sezernierten Proteine ist die Position, in der p45 zu erwarten wäre, durch Punkte umrandet.

Zellen



Medium



Inkubation mit Lysosomenlysat nicht verändert wurde (nicht gezeigt). Auch die Tyrosinsulfatanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Tabelle C.14). D.h., sowohl das Proteingerüst der Sekretogranine als auch die Tyrosin-O-sulfatesterbindung waren unter diesen Bedingungen stabil. Das Fehlen nachweisbarer Mengen an proteingebundenem Tyrosinsulfat in Lysosomen war also nicht durch hydrolytische Aktivität erklären.

Demnach sind lysosomale Proteine zwar an Kohlenhydrat sulfatiert, aber nicht bzw. sehr selten an Tyrosin.

C.3.2.4 p45, ein nicht-sekretorisches, tyrosinsulfatiertes Protein

Die Analyse der leichten Membranen (^{35}S)-sulfatmarkierter Hautfibroblasten zeigte, daß eine sulfatierte Proteinbande mit apparentem Molekulargewicht von 45 kD während der Chase-Periode mit den Zellen assoziiert blieb (Pfeilspitzen in Abb. C.47B). Die Intensität der Sulfatmarkierung dieser Proteinbande war über die gesamte Chase-Periode von 100 min konstant. Die Tyrosinsulfatanalyse des durch zweidimensionale PAGE gereinigten Proteins ergab, daß 45% des inkorporierten (^{35}S)-Sulfats als Tyrosinsulfat vorlagen. Daher erschien es wichtig, die Lokalisation dieses Proteins, das entsprechend seinem Molekulargewicht p45 genannt wurde, näher zu untersuchen. Das sulfatierte p45 war auch in HepG2-Zellen vorhanden, es komigrierte bei der zweidimensionalen PAGE mit p45 aus Fibroblasten

(nicht gezeigt). Auch in HepG2-Zellen war p45 ausschließlich im Zellhomogenat, nicht im Kulturmedium nachweisbar (Abb. C.48).

C.3.2.4.1 p45, ein lösliches, in Membranen eingeschlossenes, tyrosinsulfatiertes Protein

Da p45 nicht in das Medium sezerniert wurde, stellte sich zunächst die Frage, ob es innerhalb der Zellen lokalisiert ist, oder ob es oberflächlich mit der Plasmamembran assoziiert, also ein sekretorisches Protein der extrazellulären Matrix ist. Dazu wurden menschliche Hautfibroblasten mit (^{35}S)-Sulfat markiert, isoton homogenisiert und differentiell zentrifugiert (s. Schema in Abb. C.49a). Die gesamten Membranvesikel des postnukleären Überstands (1000 x g - Überstand) wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert, anschließend hypoton lysiert und nochmals zentrifugiert, um den löslichen Inhalt der Vesikel von den Membranen zu trennen. Die resultierenden Proteinfraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Im Überstand der ersten Ultrazentrifugation, der im wesentlichen Proteine des Cytosols enthält, war wenig p45 nachweisbar (Abb. C.49a, C). Der überwiegende Teil von p45 wurde mit den Membranvesikeln sedimentiert und befand sich nach hypotoner Lyse ausschließlich im Überstand der zweiten Ultrazentrifugation (Abb. C.49a, I). Dieses Ergebnis besagt, daß p45 mit großer Wahrscheinlichkeit ein lösliches, in Membranvesikel eingeschlossenes Protein darstellt. Es war jedoch nicht auszuschließen, daß p45 mit der Oberfläche von Membranvesikeln (z.B. korrekt orientierten Plasmamembranvesikeln) assoziiert und die Wechselwirkung mit der Membran im

Abb. C.49: p45, ein lösliches, in Membranvesikel eingeschlossenes Protein.

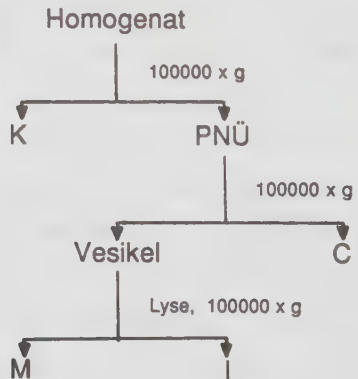
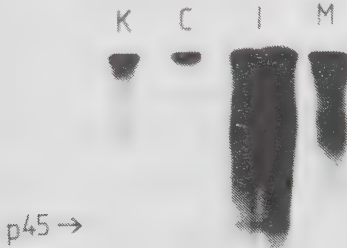
(A) Differentielle Zentrifugation.

Mit (^{35}S)-Sulfat markierte menschliche Hautfibroblasten wurden isotonisch homogenisiert und ein postnukleärer Überstand (PNÜ) hergestellt (s. Methoden, B.8.2). Die gesamten Membranvesikel des PNÜ wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert, anschließend hypoton lysiert und nochmals zentrifugiert, um die Membranen und ihren löslichen Inhalt zu trennen (Methoden B.8.5). Das Schema der Zentrifugationen ist rechts dargestellt. Die resultierenden Proteinfractionen (K = Zellkerne, C = Cytosol, I = löslicher Inhalt der Membranen und M = Membranen) wurden durch SDS-PAGE analysiert. Abgebildet sind die Fluorogramme (links). K, C, M und die linke Spur von I enthalten jeweils gleiche Volumenanteile jeder Fraktion, die rechte Spur von I enthält die doppelte Menge. Der Pfeil bezeichnet die Position von p45.

(B) Proteinasebehandlung des postnukleären Überstands.

HepG2-Zellen wurden mit (^{35}S)-Sulfat markiert (10 min, 0,3 mCi/ml). Nach einer Chase-Periode von 2h wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt. Aliquots des PNÜ wurden in der Kälte mit Proteinase K behandelt (Spur 2, 4 und 6) (s. Methoden, B.8.6). Bei einem Teil der Proben wurden die Membranen durch Saponinzusatz (3, 4) oder durch hypotonen Schock (5, 6) lysiert. Als Kontrolle diente jeweils eine Probe, die ohne Proteinase inkubiert wurde (Spur 1, 3 und 5). Am Ende der Inkubation wurden die Membranen abzentrifugiert und jeweils die Überstände und Membranen durch SDS-PAGE analysiert. Abgebildet sind die Fluorogramme in der Molekulargewichtsregion von p45 (Pfeil). N: Membransediment, L: löslicher Überstand.

A



B

	1	2	3	4	5	6
	N	L	N	L	N	L
→						
PrK	-	+	-	+	-	+
Sap.	-	-	+	+	-	-
hypo	-	-	-	-	+	+

hypotonischen Milieu gelöst worden war.

Um die Orientierung des Proteins, d.h. seine Lokalisation innerhalb von Membranvesikeln oder an deren Oberfläche zu klären, wurde untersucht, ob p45 im postnukleären Überstand der Hydrolyse durch Proteasen zugänglich ist. Von oberflächlich mit Membranvesikeln assoziierten Proteinen ist zu erwarten, daß sie bei Proteasebehandlung intakter Vesikel hydrolysiert werden, während der Inhalt der Vesikel vor Proteasen geschützt ist. Für die Proteasebehandlung wurden HepG2-Zellen mit (^{35}S)-Sulfat pulsmarkiert und ein Chase angeschlossen, um sicherzustellen, daß sulfatmarkierte sekretorische Proteine und Plasmamembranproteine ihren Bestimmungsort, die Zelloberfläche erreicht hatten. Nach isotonischer Homogenisation wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt und mit Proteinase K inkubiert. Anschließend wurden die Membranen sedimentiert und jeweils das Membransediment sowie der lösliche Überstand durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Verglichen mit der Kontrolle (Inkubation des PNÜ ohne Proteinase K) war nach der Proteasebehandlung keine Abnahme der Sulfatmarkierung von p45 zu beobachten, und p45 wurde in beiden Fällen vollständig mit den Membranen sedimentiert (Abb. C.49b, Spur 1 und 2). Um zu zeigen, daß p45 durch Proteinase K verdaut werden kann, wenn es für das Enzym zugänglich ist, wurden die Membranen durch Zusatz von Saponin bzw. durch Verdünnen mit hypotonischem Puffer und anschließender Ultraschallbehandlung lysiert. Nach der Lyse blieb p45 bei der Kontrollinkubation überwiegend im löslichen Überstand der Ultrazentrifugation (Abb. C.49b, Spur 3 und 5). Bei Zusatz von Proteinase unter gleichen Bedingungen wurde das solubilisier-

p45 vollständig hydrolysiert (Abb. C.49b, Spur 4 und 6). Dieses Ergebnis zeigt, daß p45 bei der Proteinasebehandlung des isotonen postnukleären Überstands deshalb nicht hydrolysiert wurde, weil es im Innern der intakten Membranen geschützt war. (Daß nach hypotoner Lyse noch ein kleiner Anteil von p45 vor der Proteinasehydrolyse geschützt war und mit den Membranen sedimentierte, läßt sich durch unvollständige Lyse der Vesikel erklären: beim Verdünnen des postnukleären Überstands wurde die Osmolarität weniger stark herabgesetzt als bei der hypotonen Lyse des Membransediments im vorhergehenden Versuch (vgl. Abb. C.49a)). Einen zusätzlichen Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisation von p45 lieferte die selektive Markierung der Plasmamembranproteine intakter Fibroblasten mit ^{125}J und Lactoperoxidase oder mit ^{125}J Jodsulfanilsäure (Wagner und Kelly, 1979), bei der kein Einbau von Radioaktivität in p45 zu beobachten war (nicht gezeigt).

P45 ist also ein tyrosinsulfatiertes, intrazelluläres, lösliches Protein, und es ist in einem membranumschlossenen Zellkompartiment lokalisiert. Die genaue Lokalisation wurde im Folgenden durch Immuncytochemie weiter untersucht.

C.3.2.4.2 Immuncytochemische Lokalisierung von p45

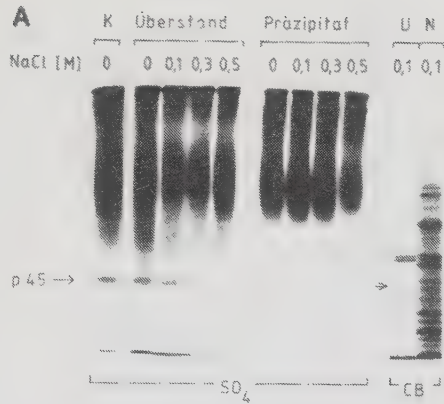
1) Reinigung von p45 und Gewinnung von Antiseren

Für die Durchführung der Immuncytochemie mußte p45 zunächst gereinigt und spezifische Antikörper dagegen gewonnen werden. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß p45 wie die Sekretogranine hitzestabil ist (Abb. C.50a). P45 konnte nach dem

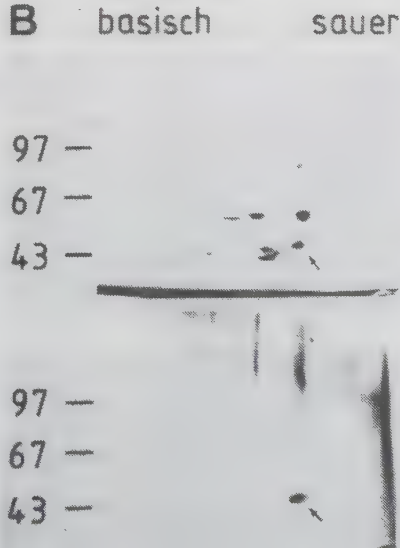
Abb C.50: Reinigung von p45.

(A) Hitzestabilität.

p45 wurde aus (^{35}S)-sulfat-markierten Fibroblasten durch differentielle Zentrifugation angereichert wie in Abb. C.49A beschrieben (s. Methoden B.8.5). Der lösliche Inhalt der Zellmembranen (I in Abb. C.49A) wurde auf 0,1–0,5 M NaCl eingestellt, 5 min auf 100°C erhitzt (vgl. Methoden, B.6.2) und die hitzedenaturierten Proteine durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der hitzestabile, lösliche Überstand (U) und das Präzipitat (N) wurden durch SDS-PAGE, Färbung mit Coomassie Blau (CB) und Fluorographie (SO_4) analysiert. K = unbehandelte Kontrolle. Der Pfeil bezeichnet die Position von p45.



(B) Zur präparativen Reinigung von p45 wurde der hitzestabile Überstand (nach Hitzebehandlung in 0,1 M NaCl, vgl. A) durch zweidimensionale SDS-PAGE aufgetrennt. Oben: Proteinfärbung mit Coomassie Blau, unten: Autoradiogramm. Der pH-Gradient reichte von pH3,5 bis 7. Die Molekulargewichte der Standardproteine in kD sind links angegeben. Die durch einen Pfeil markierte Proteinbande (p45) wurde in einem nicht gefärbten Gel aufgrund des Autoradiogramms lokalisiert, ausgeschnitten und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet (Methode B.7.1).



gleichen Verfahren wie die Sekretogranine gereinigt werden: durch hypotone Solubilisierung, Hitzebehandlung der löslichen Zellproteine, DEAE-Chromatographie und zweidimensionale SDS-PAGE (Abb. C.50b). Alternativ wurde bei einigen Präparationen p45 durch fraktionierte Zentrifugation angereichert und der lösliche Inhalt der Membranvesikel (s. Abb. C.49a, I) einer Hitzebehandlung unterworfen.

Es wurden zwei Kaninchen immunisiert. Beide Tiere lieferten Antiseren, die im Immunoblot an p45 banden (Abb. C.51, AS). Zusätzlich war jedoch bei beiden Antiseren wie auch bei den Präimmunseren (Abb. C.51, pI) unspezifische Bindung an verschiedene Proteine des Fibroblastenzellhomogenats zu beobachten, obwohl für die Immunisierung zur Homogenität gereinigtes Protein verwendet worden war. Um spezifisch gegen p45 gerichtete Antikörper zu erhalten, wurde eine Immunoaffinitätschromatographie durchgeführt: Eine angereicherte Fraktion von p45 wurde an Cyanbromid-aktivierter Sepharose immobilisiert und der Antikörper bei neutralem pH-Wert an die p45-Sepharose gebunden. Elution bei saurem pH-Wert lieferte einen Antikörper mit hoher Spezifität für p45 (Abb. C.51, Ig).

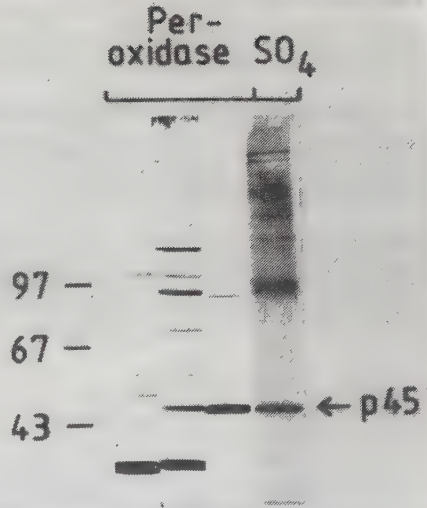
2) Immuncytochemie

Auf Deckgläschen gewachsene Fibroblasten wurden fixiert, mit Triton permeabilisiert und anschließend mit affinitätsgereinigtem Anti-p45-Antikörper inkubiert. Die gebundenen Anti-p45-Antikörper wurden durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (s. Methoden B.7.6). Verglichen mit Präimmun-IgG (Abb. C.52B)

Abb. C.51: Vergleich der Spezifität des anti-p45-Antiserums und des affinitäts-gereinigten anti-p45-Immunglobulins.

(³⁵S)-sulfatmarkierte

Fibroblastenzellproteine (je Spur 50 µg Homogenat) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Bindung der Antikörper und deren Nachweis durch Peroxidase (3 Spuren, links) erfolgte wie in B.7.3 beschrieben. Die Position von p45 (Pfeil) wurde durch Vergleich mit dem Autoradiogramm der sulfatmarkierten Proteine identifiziert (rechte Spur). pI: Präimmunserum, AS: anti-p45-Antiserum, Ig: affinitäts-gereinigtes Immunglobulin.



Antikörper: pI AS Ig -

Abb. C.52: Lokalisation des nicht-sekretorischen tyrosinsulfatierten Proteins p45 im ER menschlicher Hautfibroblasten: Indirekte Immunfluoreszenz.

Fixierte und mit Triton permeabilisierte Fibroblasten wurden mit affinitätsgereinigtem anti-p45-Immunglobulin (links) bzw. Präimmun-IgG (rechts) inkubiert. Die gebundenen Immunglobuline wurden durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Methode B.7.6). (A, B): indirekte Immunfluoreszenz; (C, D): Nomarsky-Interferenzbild der entsprechenden Zelle; Pfeilspitzen: Zellkern. Vergrößerung: 1250-fach, Balken = 10 µm.

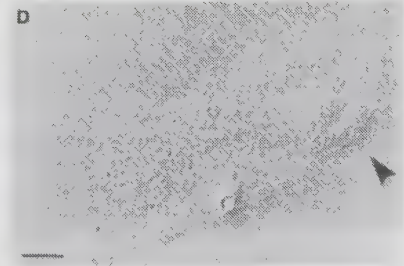
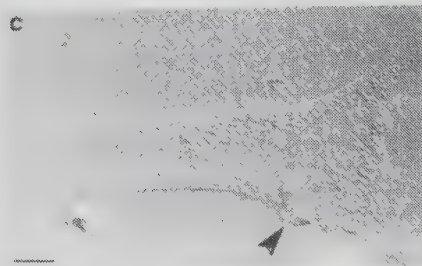
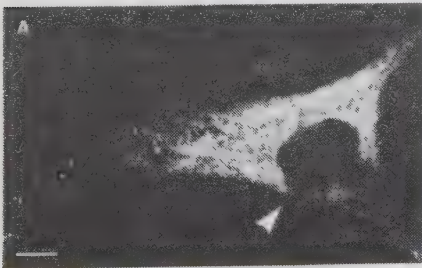
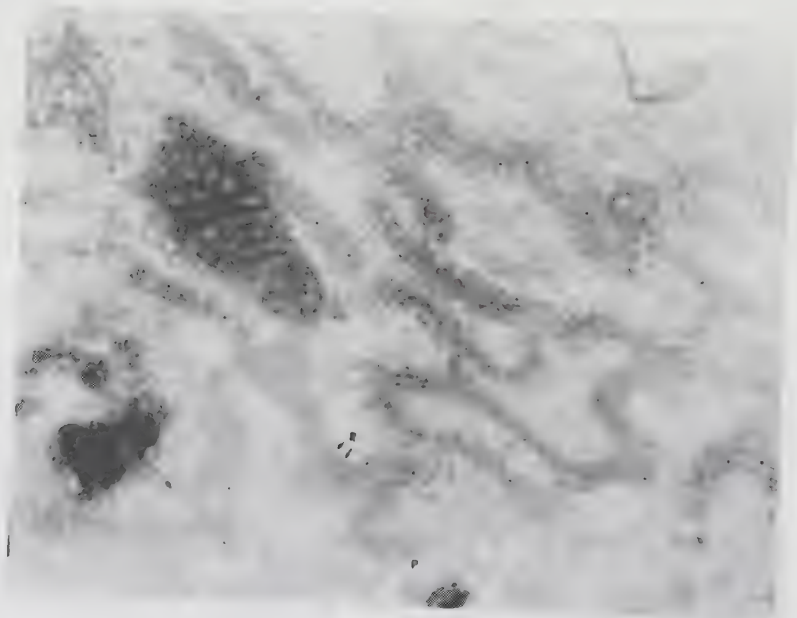


Abb. C.53: Lokalisation des nicht-sekretorischen tyrosinsulfatierten Proteins p45 im Lumen des rauen ER menschlicher Hautfibroblasten: Immunogold-Markierung (durchgeführt von Dr. Griffith).

Gefrierschnitte (0,08 µm) von menschlichen Hautfibroblasten wurden mit affinitätsgereinigtem anti-p45-Antikörper inkubiert und die gebundenen Antikörper durch Protein A-Gold nachgewiesen. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat kontrastiert (Methode s. Griffith et al., 1985). E = Endosom, M = Mitochondrium, P = Plasmamembran, R = Ribosom des rauen ER.

Vergrößerung: x 48 000.



lieferte der affinitätsgereinigte Antikörper intensive Fluoreszenz, die in der perinukleären Region konzentriert war und ein deutlich granuläres Muster aufwies (Abb. C.52A). Innerhalb des Zellkerns war keine Fluoreszenz sichtbar. Dieses Muster der Fluoreszenz ist typisch für Proteine des ER. Zusätzliche immunocytochemische Untersuchungen auf elektronenmikroskopischer Ebene, die in Zusammenarbeit mit Dr.G.Griffith (EMBL, Heidelberg) durchgeführt wurden, bestätigten, daß der Hauptanteil von p45 im ER lokalisiert war, und zwar im Lumen des rauen ER (Abb. C.53). Mitochondrien und Zellkern wurden nicht durch anti-p45-Antikörper gefärbt. Die Identifizierung weiterer Membranstrukturen, die p45 enthielten, steht noch aus.

C.3.3 Diskussion

C.3.3.1 Sekretorische Proteine, die am häufigsten tyrosin-sulfatierten Proteine

Die Bilanz der Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats aus Zellkulturen zeigte für alle untersuchten Zelltypen, daß sowohl bei Puls-Chase-Experimenten als auch bei Langzeitmarkierungen der überwiegende Anteil (60-90%) des proteingebundenen Tyrosinsulfats sezerniert wurde (Abschnitt C.3.2.1). Im Vergleich mit den übrigen, zellassozierten Proteinen konnten folgende Aussagen getroffen werden:

1) Der hohe Grad der Tyrosinsulfatierung sekretorischer Proteine verglichen mit zellassozierten Proteinen ist konsistent mit den publizierten Daten zur Lokalisation der Tyrosylproteinsulfotrans-

ferase im Golgi-Apparat (Lee und Huttner, 1985).

Bezogen auf den Tyrosineinbau enthielten sekretorische Proteine 10-20mal mehr Tyrosinsulfat als zelluläre Proteine (Tabelle C.9 und C.11). D.h., die große Menge proteingebundenen Tyrosinsulfats im Medium war weder durch eine besonders hohe Biosyntheserate und infolgedessen hohe Sulfatierungsrate der sekretorischen Proteine noch durch schnellere proteolytische Degradation der zellulären Proteine im Vergleich zu den sekretorischen Proteinen verursacht. Da die Tyrosinsulfatierung eine irreversible Modifikation ist (Huttner nicht veröffentlicht und Abb. C.47C), kann das Ergebnis auch nicht durch schnellere Desulfatierung der zellulären Proteine im Vergleich zu den sekretorischen Proteinen erklärt werden.

2) Verglichen mit der Kohlenhydratsulfatierung, die wie die Tyrosinsulfatierung im Golgi-Apparat stattfindet, war Tyrosinsulfat bei 3 von 4 Zelllinien in sekretorischen Proteinen angereichert:

Der Vergleich der Quotienten aus Tyrosinsulfat- und Tyrosingehalt hatte den sekretorischen Proteinen, einer homogenen Klasse von Proteinen, die zellassozierten Proteine, also ein extrem heterogenes Gemisch von Proteinen aller Zellkompartimente gegenübergestellt. Diese Darstellungsweise erlaubte keine Aussage, ob von den Proteinklassen, die den Golgi-Apparat passieren, bevorzugt eine (z.B. die sekretorischen Proteine) oder mehrere (darunter z.B. die Plasmamembranproteine) tyrosinsulfatiert werden. Daher wurde als zweite Bezugsgröße der Kohlenhydratsulfateinbau gewählt, eine kovalente Modifikation,

die ebenfalls nur im Golgi-Apparat, dem Durchgangskompartiment sekretorischer Proteine stattfindet. Bezogen auf den Kohlenhydratsulfatgehalt lag bei HepG2- und Ltk⁻-Zellen sowie menschlichen Hautfibroblasten, bei denen die meisten sekretorischen Proteine löslich im Medium gefunden werden, der Tyrosinsulfatgehalt der Proteine des Mediums höher als der der zellassozierten Proteine (je nach Zelltyp um einen Faktor 2 bis 5,7, Tabelle C.9 und C.10). Bei diesen Zelltypen tritt also die Tyrosinsulfatierung bei sekretorischen Proteinen häufiger auf als bei den übrigen den Golgi-Apparat durchlaufenden, an Kohlenhydraten sulfatierten Proteinen. Bei den reguliert sezernierenden Zelllinien, bei denen nur ein Teil der sekretorischen Proteine analysiert werden konnte, wurde in sekretorischen Proteinen etwa gleichviel an Makromoleküle gebundenes Kohlenhydratsulfat und Tyrosinsulfat gefunden (AtT20-Zellen) oder sogar mehr an Makromoleküle gebundenes Kohlenhydrat (PC12-Zellen). Um festzustellen, ob diese Ergebnisse für das gesamte Spektrum der sekretorischen Proteine von AtT-20- und PC12-Zellen zutreffen, oder ob auch bei diesen Zellen proteingebundenes Tyrosinsulfat im Vergleich zum Kohlenhydratsulfat bevorzugt sezerniert wird, sind weitere Untersuchungen notwendig.

3) Neben der großen Masse der sekretorischen tyrosinsulfatierten Proteine blieb ein je nach Zelltyp variabler, aber signifikanter Teil der tyrosinsulfatierten Proteine mit den Zellen assoziiert. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die Lokalisation tyrosinsulfatierter Proteine innerhalb der Zelle zu untersuchen.

Ein Teil der zellassozierten tyrosinsulfatierten Proteine könnten Proteine der extrazellulären Matrix, also ebenfalls sekretorische Proteine sein, oder während der Markierung aus dem Zellkulturmedium endocytisierte sekretorische Proteine. Daher müssen die gemessenen Werte für die Sekretion tyrosinsulfatierter Proteine (Tabelle C.10) als Mindestwerte betrachtet werden.

Die Endocytoserate konnte bei den Puls-Chase-Experimenten durch häufiges Wechseln des Mediums niedrig gehalten werden. Außerdem war das Volumen des Mediums in allen Versuchen mindestens um zwei Zehnerpotenzen größer als das Volumen der Zellen, sodaß diese immer nur einen Bruchteil der löslich im Medium vorhandenen Proteine endocytieren konnten.

Die Quantifizierung der Menge tyrosinsulfatierter Matrixproteine ist experimentell schwierig und wurde nicht durchgeführt. Zwar könnten einzelne, gut charakterisierte tyrosinsulfatierte Matrixproteine wie Nidogen oder Kollagen (vgl. Tabelle A.4) nach Immunpräzipitation analysiert werden. Für die Erfassung der gesamten Matrixproteine müßte jedoch eine Methode gefunden werden, um diese selektiv und mit guter Ausbeute von der Plasmamembran abzulösen. Ein möglicher Versuchsansatz wäre die Analyse der tyrosinsulfatierten Proteine von Zellen, die mit Proteinase behandelt wurden, verglichen mit unbehandelten Zellen. Dabei besteht jedoch die Gefahr, daß auch die Ektodomäne von Plasmamembranproteinen hydrolysiert wird, daß also nicht-sekretorische tyrosinsulfatierte Proteine verloren gehen.

Wegen der oben genannten, technisch bedingten Schwierigkeiten, sekretorische und zellassozierte Proteine eindeutig und quantitativ voneinander zu trennen, wurde die Bilanz der

Sekretion proteingebundenen Tyrosinsulfats nicht weiter ausgearbeitet. Stattdessen wurde im Folgenden untersucht, welche zellassozierten Proteinklassen bzw. Zellkompartimente proteingebundenes Tyrosinsulfat enthalten.

C.3.3.2 Tyrosinsulfatierte Membranproteine, Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation

Die zellassozierten Proteine von HepG2-, Ltk⁻-, AtT20- und PC12-Zellen wurden entsprechend ihrer Löslichkeit in hypotonischem-, hypertonischem- und alkalischem Milieu sowie in detergenzhaltigem Puffer fraktioniert (s. Abschnitt C.3.2.2).

Der einzige Zelltyp, bei dem die Detergenzphase der Tritonkondensation für die Membranen spezifische tyrosinsulfatierte Proteine enthielt, waren die HepG2-Zellen (Abb. C.43): Drei tyrosinsulfatierte Proteine (p150, p125 und p100) wurden weder durch Puffer hoher Ionenstärke noch durch pH 11 von den Membranen extrahiert, waren also fest mit den Membranen assoziiert. Bei der Detergenzkondensation verteilten sich diese Proteine etwa je zur Hälfte auf die Wasser- und Detergenzphase. Diese zweideutige Verteilung erschien zunächst unbefriedigend, da die meisten gut charakterisierten integralen Membranproteine wie Bakteriorhodopsin (Bordier, 1981) oder das "Contact site A-Protein" aus Dictyostelium (Stadler et al., 1982) vollständig in die Detergenzphase wandern.

Bei der Gleichgewichtsverteilung zwischen zwei Phasen ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Verteilung der untersuchten Substanzen neben ihrer Löslichkeit auch von den Volumina

der beiden Phasen beeinflusst wird: da das Volumen der Wasserphase zehnmal größer ist als das der Detergenzphase, betrug die Konzentration der tyrosinsulfatierten Proteine, deren absolute Mengen sich 1:1 zwischen den beiden Phasen verteilten, in der Detergenzphase das Zehnfache des Werts in der Wasserphase. Dies ist ein starker Hinweis auf die hydrophobe Natur der drei tyrosinsulfatierten Membranproteine aus HepG2-Zellen.

Andererseits gibt es gut charakterisierte integrale Membranproteine, die sich ähnlich wie die Proteine aus HepG2-Zellen partiell in die Wasser- und Detergenzphase verteilen: Hämagglutinin beispielsweise verhält sich je nach Herkunft aus verschiedenen Virusstämmen unterschiedlich, verteilt sich entweder überwiegend in die Detergenzphase oder in die Wasserphase und läßt sich erst nach wiederholter Rekondensation der Wasserphase vollständig in die Detergenzphase überführen (M.J. Gething, unveröffentlicht). Daneben gibt es integrale Membranproteine, deren Untereinheiten eine hydrophile Pore für Ionen bilden (z.B. Acetylcholinrezeptor, Mahler und Singer 1985). Aufgrund der hydrophilen Domäne verteilen sich die Proteinuntereinheiten des Acetylcholinrezeptors überwiegend in die Wasserphase. Hämagglutinin und der Acetylcholinrezeptor sind amphiphile Proteine, d.h. sie besitzen hydrophobe/lipophile Domänen zur Verankerung in der Membran und gleichzeitig hydrophile Domänen, die zur Wasserlöslichkeit beitragen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die zweideutige Verteilung von Proteinen bei der Detergenzkondensation ist die Wechselwirkung löslicher Proteine mit Membranproteinen, sofern diese nicht durch die Membranextraktionen oder durch Triton aufgehoben

wird. So könnte z.B. ein an sich hydrophiler Ligand durch Bindung an einen membrandurchspannenden Rezeptor in die Detergenzphase überführt werden, während der freie Ligand in der Wasserphase bleibt. Umgekehrt könnte ein Membranprotein durch Interaktion mit einem stark hydrophilen Liganden in die Wasserphase fehlgeleitet werden. Beide Möglichkeiten können am Verhalten der Proteine bei wiederholter Detergenzkondensation unterschieden werden. Daß sich das tyrosinsulfatierte Membranprotein p150 aus HepG2-Zellen auch bei der Rekondensation aus Wasser- und Detergenzphase jeweils wieder 1:1 verteilte, spricht dafür, daß es sich um ein amphiphiles Protein handelte, das einer Gleichgewichtsverteilung gehorchte (Abschnitt C.3.2.2.2).

Bei den AtT20- und PC12-Zellen waren zwar für die Detergenzphase spezifische mit Coomassie Blau gefärbte- und sulfatierte Banden, jedoch keine für diese Phase spezifischen tyrosinsulfatierten Membranproteine nachweisbar. Das Muster der tyrosinsulfatierten Proteine in der Detergenzphase unterschied sich nicht signifikant von dem der hypoton löslichen Proteinfraction (Abb. C.42). Es handelte sich dabei also vermutlich um kontaminierende lösliche Proteine. Die Tatsache, daß geringe Mengen der Sekretogranine auch in der Detergenzphase nachweisbar waren (Abb. C.39D), steht nicht im Widerspruch zu ihrer für sekretorische Proteine typischen hohen Wasserlöslichkeit, da der weitaus überwiegende Teil der Sekretogranine - wie bei der Gleichgewichtsverteilung für hydrophile Proteine zu erwarten - in der Wasserphase blieb. Bei Mausfibroblasten (Ltk⁻-Zellen) war in der Detergenzphase kaum proteingebundenes Tyrosinsulfat nachweisbar (Abb. C.40), während

die Membranen von menschlichen Hautfibroblasten nach Extraktion bei pH 11 noch beträchtliche Mengen proteingebundenen Tyrosinsulfats enthielten (nicht gezeigt). Die Membranproteine der menschlichen Hautfibroblasten wurden bisher nicht näher charakterisiert, doch war dieses vorläufige Ergebnis insofern interessant, als auch die HepG2-Zellen, deren Membranen spezifische tyrosinsulfatierte Proteine enthalten, eine menschliche Zelllinie sind. Um festzustellen, ob die Tyrosinsulfatierung von Membranproteinen auf bestimmte Gewebe oder Species beschränkt ist, wären weitere Untersuchungen notwendig.

Im Zusammenhang mit der eingangs formulierten Arbeitshypothese, daß die Tyrosinsulfatierung eine spezifische Modifikation sekretorischer Proteine sein könnte, stellte sich die Frage, in welchen Zellmembranen die tyrosinsulfatierten Membranproteine der HepG2-Zellen lokalisiert sind: sind es intrazelluläre Membranen (etwa Membranen des Golgi-Apparats, der Lysosomen etc.) oder handelt es sich um Plasmamembranproteine, die wie die sekretorischen Proteine an die Zelloberfläche transportiert werden? Plasmamembranproteine sind zwar im Gegensatz zu den sekretorischen Proteinen nicht löslich, werden jedoch in denselben Transportvesikeln wie konstitutiv sekretorische Proteine zur Zelloberfläche transportiert. (Strous et al., 1983). Die Proteinasebehandlung intakter HepG2-Zellen zeigte, daß das tyrosinsulfatierte Membranprotein p150 innerhalb der Zellen vor Proteinasen geschützt war und erst nach Öffnen der Zellen durch hypotone Lyse von Proteinasen verdaut wurde

(Abb. C.44). P150 ist also kein Protein der Zelloberfläche.

Während diese Arbeiten durchgeführt wurden, erschien eine Veröffentlichung über die "in vivo-Tyrosinsulfatierung eines Membranproteins" (p60) aus A431-Zellen (Liu und Baenziger, 1986). Die Aussage der Autoren scheint zwar die hier vorgelegten Ergebnisse mit HepG2-Zellen zu bestätigen. Da jedoch die Sulfatierung dieses Proteins nur in Gegenwart unphysiologisch hoher Mangankonzentrationen (2-5 mM, also ca. 100-fach höher als im Organismus), nicht dagegen in Standard-Zellkulturmedium stattfand, erscheint es äußerst fraglich, ob p60 in vivo tatsächlich sulfatiert wird. Nach meinen Beobachtungen waren in Gegenwart von 5 mM Manganchlorid mindestens 35% der Zellen lysiert, d.h. sie wurden durch Trypan-Blau gefärbt und mikroskopisch konnte nach wenigen Minuten die Freisetzung von Organellen (Zellkerne) in das Kulturmedium beobachtet werden. Die Sulfatierung von p60 stellt demnach höchstwahrscheinlich eine zellfreie Sulfatierung dar, d.h. ein unphysiologisches Artefakt nach Lyse der Zellen durch Mangan, vergleichbar mit der zellfreien Sulfatierung des cytoplasmatischen Proteins Tubulin. Letztere findet nur nach Solubilisierung der Zellmembranen, z.B. durch Detergentien statt (Lee und Huttner, 1985).

C.3.3.3 Lysosomale Proteine

In Puls-Chase-Versuchen waren in den Lysosomen keine signifikanten Mengen tyrosinsulfatierter Proteine nachweisbar. Nach Langzeitmarkierung enthielten die Lysosomen tyrosinsulfatierte Proteine, deren Menge jedoch im Verhältnis zu den sulfatierten

Proteinen in den leichten Membranen und den sekretorischen Proteinen sehr gering war (s. Tabelle C.13). Lysosomale Proteine sind also entweder nur in geringem Ausmaß tyrosinsulfatiert oder tyrosinsulfatierte Proteine, die in die Lysosomen gelangen, werden schnell degradiert. Die Analyse der gesamten Proteine der Lysosomenfraktion erlaubte allerdings keine Unterscheidung, ob es sich bei den in den Lysosomen gefundenen tyrosinsulfatierten Proteinen um lysosomale Enzyme bzw. andere dauerhafte Bestandteile der Lysosomen handelte oder um sekretorische Proteine, die durch Endocytose in die Lysosomen transportiert wurden und für die Degradation bestimmt waren. Daher wurden in Zusammenarbeit mit Prof. v. Figura weiterführende Experimente begonnen, um lysosomale Enzyme durch spezifische Bindung an eine Mannose-6-Phosphat-Rezeptorsäule anzureichern (vgl. Abschnitt A.3.2). Die vorläufige Analyse einer solchen angereicherten Fraktion zeigte, daß weniger als 6% der sulfatmarkierten Proteine aus Lysosomen an die Mannose-6-Phosphat-Säule banden (nicht gezeigt). Wegen der geringen Radioaktivitätsmengen war bisher keine Tyrosinsulfatanalyse der angereicherten lysosomalen Enzyme möglich.

Da der Gesamtsulfateinbau in lysosomale Enzyme sehr gering ist, ist die Tyrosinsulfatierung lysosomaler Proteine zwar mit den gegenwärtigen Ergebnissen nicht völlig auszuschließen, scheint jedoch ein äußerst seltenes Ereignis zu sein.

Da die lysosomalen Proteine ebenso wie die sekretorischen Proteine durch den Golgi-Apparat transportiert und im trans-Golgi-Apparat mit Galactose und Fucose glykosyliert werden

(v. Figura und Hasilik, 1986), stellt sich die Frage, warum sie nicht oder nur wenig durch Sulfatierung modifiziert werden. Sind die lysosomalen Enzyme schlechte Substrate für die Tyrosylproteinsulfotransferase, entweder da sie an der Moleküloberfläche keine Tyrosinreste exponieren, oder da ihnen Tyrosinreste, die in einer als Erkennungssequenz für die Sulfotransferase geeigneten Aminosäuresequenz vorkommen, fehlen (Erkennungssequenz, s. Abschnitt A.1)? Oder umgehen die lysosomalen Enzyme auf ihrem Weg durch den Golgi-Apparat diejenigen Zisternen, in denen die Sulfotransferasen lokalisiert sind? Letzteres würde bedeuten, daß die Transportwege der sekretorischen und lysosomalen Proteine zwar bis zum Transfer von Galactose identisch sind, daß sich jedoch danach die Wege verzweigen und sekretorische und lysosomale Proteine jeweils in andere Vesikel verpackt werden müßten. Diese Hypothese ließe sich mit den bisherigen Kenntnissen über den Golgi-Apparat vereinbaren, da (1) die Sulfatierung vermutlich zeitlich nach dem Transfer von Galactose stattfindet (Bäuerle und Huttner 1987) und (2) noch nicht genau bekannt ist, an welcher Stelle die Wege der sekretorischen und lysosomalen Proteine divergieren. Es wäre möglich, daß Galactosyltransferasen und Sulfotransferasen nicht nur zeitlich sequentiell arbeiten sondern auch räumlich getrennt sind und daß der Transportweg für lysosomale Proteine zwischen den beiden Stationen abzweigt.

C.3.3.4 Tyrosinsulfatierte, nicht-sekretorische, lösliche Proteine - Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation

Die Tyrosinsulfatanalyse verschiedener Proteinfractionen hatte gezeigt, daß mehr als 50% der zellassozierten tyrosinsulfatierten Proteine entweder im hypotonen Milieu, bei hoher Ionenstärke oder alkalischem pH-Wert löslich waren, und zwar auch in den Zellen, die keine reguliert sekretorischen (also löslichen) Proteine intrazellulär speichern (Abb. C.40, HepG2 und Ltk⁻). Es handelte sich dabei also um lösliche, zellassozierte Proteine oder um periphere Membranproteine. Wie bereits erwähnt, könnte ein Teil dieser Proteine periphere, zur Zelloberfläche hin orientierte Plasmamembranproteine darstellen, d.h. sekretorische Bestandteile der extrazellulären Matrix sein (s. Abschnitt C.3.3.1). Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten jedoch erste Hinweise für die Existenz intrazellulär lokalisierter, löslicher, tyrosinsulfatierter Proteine (z.B. p45 aus menschlichen Hautfibroblasten, Abschnitt C.3.2.4). Dies zeigt, ebenso wie die Tyrosinsulfatierung der Membranproteine in HepG2-Zellen (s. Abschnitt C.3.2.2.2), daß die Tyrosinsulfatierung nicht ausschließlich auf sekretorische Proteine beschränkt ist.

Die immuncytochemischen Untersuchungen bestätigten, daß p45 wie alle bisher charakterisierten tyrosinsulfatierten Proteine und in Übereinstimmung mit der Lokalisation der Tyrosylproteinsulfo-transferase im ER/Golgi-Komplex synthetisiert wird. Überraschend war die überwiegende Lokalisation von p45 im rER. In anderen Kompartimenten (z.B. in Endosomen) waren bei der elektronenmikroskopischen Immuncytochemie nur vereinzelte Goldkörner nachweisbar (nicht gezeigt), es muß noch überprüft

werden, ob diese Beobachtung signifikant ist.

Da die Tyrosinsulfatierung nach dem bisherigen Wissensstand im trans-Golgi-Apparat stattfindet, muß durch weitere Experimente geklärt werden, ob p45 in den ER-Zisternen in sulfatierter Form vorliegt (z.B. durch Zellfraktionierung, d.h., Isolierung von rER und Golgi-Apparat, oder durch Analyse der zeitlichen Abfolge von Tyrosin-, Sulfat- und Kohlenhydrateinbau in p45). Daß p45 im rER sulfatiert ist, ist unwahrscheinlich, denn bisher wurden weder Tyrosylproteinsulfotransferasen im ER beschrieben noch wurde der Rücktransport eines Proteins vom trans-Golgi-Apparat in das ER beobachtet. Daher ist anzunehmen, daß das rER ein Reservoir für das unsulfatierte Vorläuferprotein von p45 darstellt, aus dem das Protein nur langsam an seinen Bestimmungsort transportiert und auf dem Weg dorthin im trans-Golgi-Apparat sulfatiert wird. In ähnlicher Weise werden einige konstitutiv sekretorische Proteine in großen Mengen im ER bereitgestellt, und der Transport vom ER in den Golgi-Apparat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für ihre Sekretion (Fries et al., 1984).

Alternativ könnte p45 ein Bestandteil des rER sein, der normalerweise das rER nicht verläßt und nicht tyrosinsulfatiert ist. In diesem Fall könnte die beobachtete Tyrosinsulfatierung von p45 dadurch erklärt werden, daß ein kleiner Teil von p45 aufgrund ineffizienter Retention im rER den Golgi-Apparat erreicht (Fehlsortierung), dort sulfatiert und anschließend im Lysosom degradiert wird. Dagegen spricht, daß die Intensität der Sulfatmarkierung von p45 nach Chase nicht abnahm.

Die Untersuchung der genauen Lokalisation von sulfatiertem und

nicht sulfatiertem p45 kann wichtige Informationen zur Topographie der Tyrosinsulfatierung und zum Proteintransport in der Zelle liefern.

Über das Arbeitsgebiet der Tyrosinsulfatierung hinaus könnte das Protein p45 für zellbiologische Untersuchungen nützlich sein, sobald seine Lokalisation entgültig geklärt ist: Tyrosinsulfatierte Proteine lassen sich mit hoher spezifischer Radioaktivität mit (^{35}S)-Sulfat markieren und sind aufgrund ihrer Sulfatmarkierung in SDS-Gele leichter zu identifizieren als nach Aminosäuremarkierung, bei der in der Regel Überlappung mehrerer markierter Proteinbanden auftritt. Daher könnten tyrosinsulfatierte Proteine mit gut definierter Lokalisation als Markierungsproteine für das entsprechende Zellkompartiment nützlich sein, denn ihr Vorkommen in Proben einer Zellfraktionierung läßt sich in den meisten Fällen durch eindimensionale SDS-PAGE ohne vorherige Immunpräzipitation nachweisen.

D Zusammenfassende Diskussion

D.1 Die Tyrosinsulfatierung, eine kovalente Modifikation überwiegend, aber nicht ausschließlich sekretorischer Proteine

Die Frage, ob die Tyrosinsulfatierung als kovalente Modifikation nur in sekretorischen Proteinen vorkommt, ergab sich aus der Beobachtung, daß die bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine ein gemeinsames Merkmal besitzen: sie sind durchweg sekretorische Proteine (Tabelle A.4). Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, - über die Analyse einzelner Modellproteine hinausgehend - systematisch die Gesamtmenge des proteingebundenen Tyrosinsulfats in verschiedenen Geweben und in den sekretorischen Proteinen des Blutplasmas zu vergleichen (Abschnitt C.1) sowie die Kompartimentierung des proteingebundenen Tyrosinsulfats verschiedener Zelltypen zu analysieren. In Form einer Bilanz wurde die Menge an proteingebundenem Tyrosinsulfat in verschiedenen Proteinklassen gegenübergestellt (Abschnitt C.3). Diese systematische Untersuchung erschien aus folgendem Grund wichtig: Die meisten bisher beschriebenen tyrosinsulfatierten Proteine, darunter besonders die Proteine des Blutplasmas, stehen in großen Mengen als Ausgangsmaterial für die Reinigung und Charakterisierung zur Verfügung. Sie sind also experimentell sehr viel leichter zu analysieren als viele der seltener vorkommenden zellulären Proteine. Entsprechend mag die Tyrosinsulfatierung bei sekretorischen Proteinen allgemein leichter nachzuweisen sein als bei zellulären Proteinen und besonders bei Membranproteinen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten, daß sowohl im Gesamtorganismus (s. Abschnitt C.1) als auch bei allen untersuchten Zelllinien (s. Abschnitt C.3.2.1.) das meiste proteingebundene Tyrosinsulfat sezerniert wird. Im Extremfall - wie etwa bei den PC12-Zellen - können wenige sekretorische Proteine die am stärksten tyrosinsulfatierten Banden eines Zelltyps darstellen (s. Abschnitt C.2.2.1.2 und C.3.2.3).

Die Aussage der Arbeitshypothese muß jedoch dahingehend modifiziert werden, daß zwar -wie oben erwähnt - der überwiegende Teil des proteingebundenen Tyrosinsulfats sekretorisch ist, daß aber auch intrazellulär spezifische tyrosinsulfatierte, nicht sekretorische Proteine nachweisbar sind. Dabei handelt es sich sowohl um Membranproteine (s. Abschnitt C.3.2.2) als auch um lösliche Proteine (s. Abschnitt C.3.2.4).

Um die nicht-sekretorischen tyrosinsulfatierten Proteine genauer zu lokalisieren, sind weiterführende Arbeiten notwendig. Das lösliche mikrosomale Protein p45 erscheint dazu besonders geeignet, da spezifische Antikörper zur Verfügung stehen, die die Untersuchungen erleichtern. Die Charakterisierung dieses Proteins mag zwar problematisch erscheinen, da es als prominente sulfatierte Bande im SDS-Gel entdeckt wurde und seine Funktion ungeklärt ist. Es wäre jedoch - unabhängig von der Funktion des Proteins - wichtig herauszufinden, wo die tyrosinsulfatierte Form von p45 lokalisiert ist, um das Wissen über die Kompartimentierung tyrosinsulfatierter Proteine zu vervollständigen.

Da Tyrosinsulfat auch in nicht-sekretorischen Proteinen eindeutig nachweisbar ist, erscheint es sinnvoll, neben der Analyse ganzer

Zellkompartimente bzw. Proteinklassen wieder auf die Strategie der Tyrosinsulfatanalyse einzelner Proteine zurückzukommen. Um gezielt in gut charakterisierten Membranproteinen und löslichen Proteinen der vom Golgi-Apparat abstammenden Zellorganellen nach Tyrosinsulfat zu suchen, können - soweit bekannt - die Aminosäuresequenzdaten zu Hilfe genommen werden. Die statistische Auswertung der Aminosäuresequenzen von 13 bisher sequenzierten tyrosinsulfatierten Peptiden ergab nämlich eine Reihe von Gemeinsamkeiten in der Umgebung des sulfatierten Tyrosins (Huttner und Bäumler, 1987): In unmittelbarer Nähe sind mindestens 3 saure Aminosäuren und mindestens ein Helixbrecher (z.B. Prolin oder Glycin) vorhanden, während Cystein und Glykosylierungsstellen auf eine Länge von 14 Aminosäuren nicht vorkommen. Vorausgesetzt, daß diese bei sekretorischen Proteinen festgestellten Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz tyrosinsulfatierter Peptide auch bei anderen Proteinklassen auftreten, ließe sich beurteilen, ob bestimmte Tyrosinreste in einem Protein gute Substrate für die Tyrosylproteinsulfo-transferase darstellen. Nach diesen Kriterien ausgewählte Protein könnten gezielt auf Tyrosinsulfat hin analysiert werden. Diese Methode hat bereits zur Identifizierung eines weiteren tyrosinsulfatierten sekretorischen Proteins geführt: in Zusammenarbeit mit Dr.D.Jenne und Dr.K.Stanley (EMBL, Heidelberg) wurde gezeigt, daß das Plasmaprotein Vitronectin, in dessen Sequenz ein von sauren Aminosäuren umgebenes Tyrosin auffiel, tyrosinsulfatiert ist (Abb. C.54).

Abb. C.54: Vitronectin, ein tyrosinsulfatiertes sekretorisches Protein. - Vorschlag einer potentiellen Sulfatierungsstelle. (Zusammenarbeit mit Dr. D. Jenne)

Die Möglichkeit, daß Vitronectin tyrosinsulfatiert ist, wurde aufgrund der publizierten Aminosäuresequenz (Jenne und Stanley, 1985) vorhergesagt. (A): Dem Tyrosin in Position 56 (Tyr-56) gehen N-terminal in der Sequenz drei saure Aminosäuren voran, weitere saure Aminosäuren befinden sich in Position 60, 61, 63 und 64. Die Umgebung des Tyr-56 enthält weder Cystein noch N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr), Prolin in Position 52 ist ein wirksamer Helixbrecher. Aufgrund dieser Eigenschaften, die mit den Kriterien für die Sequenz tyrosinsulfatierter Peptide übereinstimmen (Huttner und Bäuerle, 1987), kommt Tyr-56 als Tyrosinsulfatierungsstelle in Frage. (B): Daß Vitronectin an Tyrosin sulfatiert ist, wurde experimentell bestätigt. Vitronectin wurde mit einem monoklonalen Antikörper aus dem Markierungsmedium von mit (^{35}S)-Sulfat markierten HepG2-Zellen immunpräzipitiert (Durchführung: Dr. Jenne, EMBL). Das Immunpräzipitat wurde durch 2D-PAGE aufgetrennt (nicht gezeigt). Die sulfatierte Bande von Vitronectin (IEP = pH4,5-5, apparentes Molekulargewicht = ca. 80 kD) wurde aus dem Gel ausgeschnitten, alkalisch hydrolysiert und einer quantitativen Tyrosinsulfatanalyse unterworfen (Methoden B.9.2.2). GSI: Gesamt-(^{35}S)-sulfat in Vitronectin vor der Hydrolyse, TOS: Tyrosin-(^{35}S)-sulfat, das nach alkalischer Hydrolyse durch Dünnschichtelektrophorese identifiziert wurde.

A50.....55.....60.....65..... Position Nr. (*)
TMPEDYTVYDDGEEK..... Aminosäure

B

Analyse	GSI (cpm)	TOS (cpm)	(TOS/GSI) x 100 (%)
I	5000	2770	55
		1650	33
II	10000	5200	52
		5755	58

(*): Position1 = N-Terminus; Abkürzungen der Aminosäuren: D=Asparaginsäure, E=Glutaminsäure, G=Glycin, K=Lysin, M=Methionin, P=Prolin, T=Threonin, V=Valin, Y=Tyrosin.

D.2 Mögliche Funktionen der Tyrosinsulfatierung

Die Analyse der Kompartimentierung tyrosinsulfatierter Proteine liefert nicht nur deskriptive topographische Daten, sondern sie erlaubt auch eine Stellungnahme zur physiologischen Funktion der Tyrosinsulfatierung. Ausgehend vom bisher beobachteten selektiven Vorkommen der Tyrosinsulfatierung in sekretorischen Proteinen war diskutiert worden, daß die Tyrosinsulfatgruppe für den Vorgang der Sekretion von Proteinen wichtig sein könnte. Eine Möglichkeit bestand darin, daß Tyrosinsulfat bei der Sortierung bestimmter sekretorischer Proteine in sekretorische Vesikel als Erkennungssignal dienen könnte - ähnlich wie die Mannose-6-Phosphatgruppe für die korrekte Sortierung lysosomaler Enzyme (vgl. Einleitung, A.3.2 und Huttner et al., 1986). Da nicht alle sekretorischen Proteine tyrosinsulfatiert sind (s. Abb. C.7, Albumin und Transferrin) mußten allerdings zusätzliche Erkennungssignale für die übrigen sekretorischen Proteine postuliert werden. Die Beobachtung, daß auch nicht-sekretorische Proteine tyrosinsulfatiert werden, spricht gegen diese Sortierungshypothese. Nimmt man an, daß die Tyrosinsulfatgruppe als Erkennungssignal für die Sekretion eines Proteins ausreicht, dann müßte das tyrosinsulfatierte p45 aus Fibroblasten und HepG2-Zellen sezerniert werden, was jedoch nicht der Fall ist. Die Sortierungshypothese kann allerdings mit den vorliegenden Daten auch nicht widerlegt werden, da die Tyrosinsulfatgruppe zusammen mit einer für sekretorische Proteine spezifischen Sequenz der umgebenden Aminosäuren als Signal wirken könnte.

Das Vorkommen der Tyrosinsulfatierung bei nicht-sekretorischen

Proteinen zeigt, daß auch andere, vom Vorgang der Sekretion unabhängige Funktionen der Tyroinsulfatgruppe in Betracht gezogen werden, beispielsweise

- die Modulation der physiologischen Funktion einzelner Proteine,
- die Veränderung ihrer Stabilität gegen Proteasen,
- die Veränderung ihrer Löslichkeit durch die Einführung einer zusätzlichen negativen Ladung (Übersicht s. Huttner und Bäumle, 1987).

ACHESON, A. L., NAUJOKS, K. und THOENEN, H. (1984). "Nerve growth factor-mediated enzyme induction in primary cultures of adrenal chromaffin cells: specificity and level of regulation" *J. Neurosci.* 4, 1771-1780.

ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I., KNOWLES, B., (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated liver carcinoma-derived cell line" *Nature* 282, 615-616.

ADRIAN, T.E., DOMIN, J., BACARESE-HAMILTON, A.J. und BLOOM, S.R. (1986). "Is the C-terminal flanking peptide of rat cholecystokinin double sulphated?" *FEBS-Letters* 196, 5-8.

AHNERT-HILGER, G. BHAKDI, S. und GRATZL, M. (1985). "Minimal requirements for exocytosis" *J. Biol. Chem.* 260, 12730-12734.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. und WATSON, J.D. (1983a). "Protein structure" in "Molecular biology of the cell" S.111-142, Garland Publishing Inc., New York.

ALBERTS et al. (1985b). "Membrane proteins", *ibidem* S.264-283.

ALBERTS et al. (1983c). "Renewal by pluripotent stem cells: Blood cell formation", *ibidem* S.918-927.

ANASTASI, A., BERTACCINI, G. und ERSPAMER, V. (1966). "Pharmacological Data on Phyllokinin (Bradykinyl-Isoleucyl-Tyrosine-O-Sulphate) and Bradykinyl-Isoleucyl-Tyrosin" *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 27, 479-485.

ANASTASI, A., ERSPAMER, V. und ENDEAN, R. (1968). "Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of Hyla caerulea" *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 57-68.

ANDERSEN, B.N. (1985). "Species variation in the tyrosine sulfation of mammalian gastrins" *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 44-50.

ANDERSON, L. und ANDERSON, N.G. (1977) "High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins" *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 74, 5421-5425.

ASHWELL, G. und MORELL, A.G. "The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins" *Adv. Enzymol.* 41, 99-128.

BAUER, C.H., HASSELS, B.F. und REUTTER, W.G (1976). "Galactose metabolism in regenerating rat liver" *Biochem. J.* 154, 141-147.

BÄUERLE, P.A. (1983). "Präparation von Serumantikörpern, die spezifisch tyrosin-O-sulfatierte Proteine erkennen." Diplomarbeit Universität Konstanz.

BÄUERLE, P.A und HUTTNER, W.B. (1985). "Tyrosine sulfation of yolk proteins 1,2, and 3 in Drosophila melanogaster" *J. Biol.*

Chem. 260, 6434-6439.

BAUERLE, P.A. und HUTTNER, W.B. (1986). "Chlorate - a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells" BBRC 141, 870-877.

BETTELHEIM, F.R. (1954) "Tyrosine-O-sulfate in a peptide from fibrinogen" J. Am. Chem. Soc. 76, 2838-2839.

BISHOP, J.M. und VARMUS, H.C. (1982). "Functions and origins of retroviral transforming genes." in "RNA tumor viruses. Molecular biology of tumor viruses." (Herausgeber: WEISS, R., TEICH, N., VARMUS, H.C. und COFFIN, J.) S. 999-1108, Cold Spring Harbor Laboratory.

BLANQUET, S., DESSEN, P. und KAHN, D. (1984) "Properties and specificity of methionyl-tRNA^{Met} formyltransferase from Escherichia coli" Methods Enzymol. 106, 141.

BLOMBÄCK, B., BOSTROM, H. und VESTERMARK, A. (1960) "On the (³⁵S)-sulphate incorporation in fibrinopeptide B from Rabbit fibrinogen" Biochem. Biophys. Acta 38, 502-512.

BODANSZKY, M., MARTINEZ, J., PRIESTLEY, G.P., GARDNER, J.D. und MUTT, V. (1978). "Cholecystokini (Pankreozymin). 4. Synthesis and properties of a biologically active analogue of the C-terminal hexapeptide with ϵ -hydroxynorleucine sulfate replacing tyrosine sulfate" J. Medicinal Chem. 21, 1030-1035.

BORDIER, C. (1981). "Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution" J. Cell Biol. 256, 1604-1607.

BORNSTEIN, P. (1974) "The biosynthesis of collagen" Ann. Rev. Biochem. 43, 567-603.

BRADFORD, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding" Analyt. Biochem. 72, 248-254.

BRODY, T. und SUTTIE, J.W. (1984). "Glutamate Carboxylase: Assays, Occurrence and specificity" Methods. Enzymol. 107, 552.

BURGESS, T.L., CRAIK, C.S. und KELLY, R.B. (1985) "The exocrine protein trypsinogen is targeted into the secretory granules of an endocrine cell line: studies by gene transfer" J. Cell Biol. 101, 639-645.

CHAMBERLAIN, J.P. (1979). "Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate" Anal. Biochem. 9, 132-135.

CHINKERS, M., MCKANNA, J.A. und COHEN, S. (1979). "Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor." J. Cell Biol. 83, 260-285.

CLEVELAND, W.D., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W. und LAEMMLI, U.K. (1977) "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel elektrophoresis" J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.

COHN, D.V., ZANGERLE, R., FISCHER-COLBRIE, R., CHU, L.L.H., ELTING, J.J., HAMILTON, J.W. und WINKLER, H. (1982). "Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6056-6059.

COHN, D.V., ELTING, J.J., FRICK, M. und ELDE, R. (1984). "Selective localization of the parathyroid secretory protein-I/ adrenal medulla chromogranin A protein family in a wide variety of endocrine cells of the rat" Endocrinology 114, 1963-1974.

DAYHOFF, M.O. (1972). "Atlas of protein sequence and structure" Band 5, D87-D97, Natl. Biomed. Res. Found. Maryland.

DOBBERSTEIN, B., GAROFF, H. und WARREN, G. (1979). "Cell-free synthesis and membrane insertion of mouse H-2D^d histocompatibility antigen and B₂-microglobulin" Cell 17, 759-769.

DOUGLAS, W.W. (1968). "Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells" Brit. J. Pharmacol. 34, 451-474.

ELDER, J.H., PICKETT II, R.A., HAMPTON, J. und LERNER, R.A. (1977) "Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices" J. Biol. Chem. 252, 6510-6515.

ETGES, R., BOUVIER, J. und BORDIER, C. (1986) "The major surface protein of Leishmania promastigotes is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid" EMBO J. 5, 597-601.

FALKENSAMMER, G., FISCHER-COLBRIE, R. und WINKLER, H. (1985a). "Biosynthesis of chromaffin granules: characterization of (³⁵S)-sulphate labelled products" J. Neurochem. 44 (Suppl.), S116 B.

FALKENSAMMER, G., FISCHER-COLBRIE, R., RICHTER, K. und WINKLER, H. (1985b) "Cell free and cellular synthesis of chromogranin A and B of bovine adrenal medulla" Neuroscience 14, 735-746.

FARQUHAR, M.G., und PALADE, G. (1981). The Golgi-Apparatus (complex) - (1954-1981) from artifact to center stage." J. Cell Biol. 91, 77s-103s.

FESSLER, L., I., BROSH, S., CHAPIN, S. und FESSLER, J.H. (1986). "Tyrosine sulfation in precursors of collagen V" J. Biol. Chem. 261, 5034-5040.

FRIES, E., GUSTAFSSON, L. und PETERSON, P.A. (1984). "Four

secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates" EMBO J. 3, 147-152.

FUJIKI, Y., HUBBARD, A.L., FOWLER, S. und LAZAROW, P.B. (1982). "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum" J. Cell Biol. 93, 97-102.

GARLICK, P.J. (1980) "Protein turnover in the whole animal and specific tissues" in Comprehensive Biochemistry (Herausgeber: Florkin, M. und Neuberger, A.) Band 19,B, 77-152, Elsevier, Amsterdam.

GERSHONI, J.M. und PALADE, G.E. (1983): "Protein blotting: Principles and applications" Analyt. Biochem. 131, 1-15.

GIESELMANN, V., POHLMANN, R., HASILIK, A. und VON FIGURA, K. (1983). "Biosynthesis and transport of Cathepsin D in cultured human fibroblasts" J. Cell Biol. 97, 1-5.

GLAUERT, A.M. (1974) "Fixation Methods" in "Practical Methods in Electron Microscopy" Bd. 3.I, S. 73-110, Elsevier, Amsterdam.

GOLDBERG, M.E. (1985) "The second translation of the genetic message: protein folding and assembly" Trends Biochem. Sci. 10, 388-391.

GREEN, E.D., van HALBEEK, H., BOIME, I. und BAENZIGER, J.U. (1985). "Structural elucidation of the disulfated oligosaccharide from bovine lutropin" J. Biol. Chem. 260, 15623-15630.

GREENE, L.A. und REIN, G. (1977). "Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells" Brain Research 129, 247-263.

GREENE, L.A. und TISCHLER, A.S. (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428.

GREGORY, H., HARDY, P.M., JONES, D.S., KENNER, G.W. und SHEPPARD, R.C. (1964). "The antral hormone gastrin" Nature 204, 931-933.

GRIFFITHS, G., PFEIFFER, S., SIMONS, K. und MATLIN, K. (1985). "Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans-cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane." J. Cell Biol. 101, 949-964.

GRIFFITHS, G. und SIMONS, K. (1986). "The trans Golgi network: Sorting at the exit site of the Golgi complex" Science, 234, 438-443.

- GRINNELL, F. und FELD, M. (1979) "Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: possible role of secreted fibronectin" *Cell* 17, 117-129.
- HAGER, D.A. und BURGESS, R.R. (1980). " Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: Results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes" *Anal. Biochem.* 109, 76-86.
- HANOVER, J.A. und LENNARZ, W.J. (1981). "Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins" *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 1-19.
- HARBOE, N.M.G. und INGILD, A. (1983). "Immunization, isolation of immunoglobulins and antibody titer determination" *Scand. J. Immunol.* 17, Suppl. 10, 345-351.
- HERZOG, V. (1985) "Secretion of sulfated thyroglobulin" *Eur. J. Cell Biol.* 39, 399-409.
- HILLE, A., ROSA, P. und HUTTNER, W.B. (1984). "Tyrosine sulfation: a post-translational modification of proteins destined for secretion?" *FEBS Letters* 177, 129-134.
- HORTIN, G., SIMS, H. und STRAUSS, A.W. (1986a). "Identification of the site of sulfation of the fourth component of human complement" *J. Biol. Chem.*, 261, 1786-1793.
- HORTIN, G., FOK, K.F., TOREN, P.C. und STRAUSS, A.W. (1986). "Sulfation of a tyrosine residue in the plasmin-binding domain of α_2 -antiplasmin." zur Publikation eingereicht.
- HUTTNER, W.B. (1982). "Sulphation of tyrosine residues - a widespread modification of proteins" *Nature* 299, 273-276.
- HUTTNER, W.B. (1984). "Determination and occurrence of tyrosine-O-sulfate in proteins." *Meth. Enzymol.* 107, 200-223.
- HUTTNER, W.B., BAEUERLE, P.A., BENEDUM, U.M., FRIEDERICH, E., HILLE, A., LEE, R.W.H., ROSA, P., SEYDEL, U. und SUCHANEK, C. (1986). "Protein sulfation on tyrosine" in *Hormones and Cell Regulation* (Herausgeber: J. NUNEZ et al.) 139, 199-217.
- HUTTNER, W.B. und BÄUERLE, P.A. (1987). "Protein sulfation on tyrosine." in "Modern cell biology" (Herausgeber: Satir, B.H.) Alan R. Liss Inc. New York, im Druck.
- IVARIE, R.D. und JONES, P.P. (1979). "A rapid and sensitive assay for specific protein synthesis in cells and in cell-free translations: Use of *Staphylococcus aureus* as an adsorbent for immune complexes" *Anal. Biochem.* 97, 24-35.
- IZANT, J.G. und WEINTRAUB, H. (1984). "Inhibition of thymidine

kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis" *Cell* 36, 1007-1015.

JAHN, R., SCHIEBLER, W. und GREENGARD, P. (1984). "A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1684-1687.

JENNE, D., HUGO, F. und BHAKDI, S. (1985). *Biosci. Rep.* 5, 343-352.

JENNE, D. und STANLEY, K. (1985). "Molecular cloning of S-protein, a link between complement, coagulation and cell adhesion." *EMBO J.* 4, 3153-3157.

JUKKOLA, A., RISTELI, J., NIEMELÄ, O. und RISTELI, L. (1986). "Incorporation of sulphate into type III procollagen by cultured human fibroblasts - Identification of tyrosine-O-sulphate" *Eur. J. Biochem.* 154, 219-224.

KARP, D.R. (1983) "Post-translational modification of the fourth component of complement" *J. Biol. Chem.* 258, 12745-12748.

KELLY, R.B. (1985). "Pathways of protein secretion in eukaryotes" *Science* 230, 25-32.

KIT, S., DUBBS, D., PIEKARSKI, L. und HSU, T. (1963). "Deletion of thymidine kinase activity from L-cells resistant to bromodeoxyuridine." *Exp. Cell Res.* 31, 297-312.

KNOWLES, B.B., HOWE, C.C und ADEN, D.P. (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen" *Science* 209, 497-499.

KREBS, E.G. und BEAVO, J.A. (1979). "Phosphorylation and dephosphorylation of enzymes" *Ann. Rev. Biochem.* 48, 923-959.

KREIL, G. (1981) "Transfer of proteins across membranes" *Ann. Rev. Biochem.* 50, 317-348.

LAEMMLI, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* 227, 680-685.

LANE, N., LUCIEN, C., OTEROVILARDEBO, L.R. und GOLDMAN, G.C. (1964). "On the site of sulfation in colonic goblet cells" *J. Cell Biol.* 21, 339-351.

LAPORTE, D.C. (1984). "Antisense RNA: a new mechanism for the control of gene expression" *Trends Biochem. Sci.* 9, 463.

LEE, R.W.H. und HUTTNER, W.B. (1983). "Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 Pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase" *J. Biol. Chem.* 258, 11326-11334.

LEE, R.W.H. und HUTTNER, W.B. (1985). "(Glu⁶²,Ala³⁰,Tyr⁸) serves as high-affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: a Golgi enzyme" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6143-6147.

LEMANSKY, P., GIESELMANN, V., HASILIK, A. und VON FIGURA, K. (1984) "Cathepsin D and β -hexosaminidase synthesized in the presence of 1-deoxynojirimycin accumulate in the endoplasmic reticulum" J. Biol. Chem. 259, 10129-10135.

LINGAPPA, V.D., CHAIDEZ, J., YOST, C.S. und HEDGPETH, J. (1984). "Determinants for protein localization: β -lactamase signal sequence directs globin across microsomal membranes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 456-460.

LIU, M.-C., YU, S., SY, J., REDMAN, C.M. und LIPMANN, F. (1985). "Tyrosine sulfation of proteins from the human hepatoma cell line HepG2" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7160-7164.

LIU, N. und BAENZIGER, J.U. (1986). "In vivo and in vitro tyrosine sulfation of a membrane glycoprotein." J. Biol. Chem. 261, 856-861.

LIVETT, B.G., DEAN, D.M., WHELAN, L.G., UDENFRIEND, S. und ROSSIER, J. (1981). "Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells" Nature 289, 317-318.

LLOYD, R.V. und WILSON, B.S. (1983) "Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody" Science 222, 628-630.

LODISH, H. und KONG, N. (1984). "Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex" J. Cell Biol. 98, 1720-1729.

LOUVARD, D., REGGIO, H. und WARREN, G. (1982). "Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum" J. Cell Biol. 92, 92-107.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MAHLER, P.A. und SINGER, S.J. (1985). "Anomalous interaction of the acetylcholine receptor protein with the nonionic detergent triton X-114" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 958-962.

MAINS, R.E., EIPPER, B.A. und LING, N. (1977). "Common precursor to corticotropins and endorphins" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3014-3018.

MARSH, M., HELENIUS, A., MATLIN, K. und SIMONS, K. (1983). "Binding, endocytosis, and degradation of animal viruses" Methods Enzymol. 98, 260-265.

- MARSHALL, T. (1984) "SDS-PAGE of serum after protein denaturation in the presence and absence of 2-mercaptoethanol" Clin. Chem. 30, 475-479.
- McHUGH, E.M., McGEE, R., Jr. und FLEMING, P. (1985). "Sulfation and constitutive secretion of dopamine β -hydroxylase from rat pheochromocytoma (PC12) cells" J. Biol. Chem. 260, 4409-4417.
- MIZOBE, F. und LIVETT, B.G. (1983). "Nicotin stimulates secretion of both catecholamines and acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells" J. Neuroscience 3, 871-876.
- MULDER, G.J. (1981). "Sulfate availability in vivo" in "Sulfation of drugs and related compounds" (Herausgeber Mulder, G.J.) S.31-52 CRC Press, Florida.
- MÜLLER, G. und HEILMANN, H.-H. (1984). "Sulfatierte Makromoleküle des Bindegewebes und ihr Stoffwechsel" Biomed. Biochem. Acta 43, 867-886.
- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1975) "Complement" Ann. Rev. Biochem. 44, 697-724.
- MUTT, V. und JORPES, J.E. (1968). "Structure of porcine cholecystokinin-pankreozymin" Eur. J. Biochem. 6, 156-162.
- NEURATH, H. und WALSH, K.A. (1976) "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3825-3832.
- OKLEY, B.R., KIRSCH, D.R. und MORRIS, N.R. (1980). "A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels" Analyt.Biochem. 105, 361-363.
- O'CONNOR, D.T. (1983). "Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum" Regulatory peptides 6, 263-280.
- O'CONNOR, D.T., BURTON, D. und DEFTOS, L.J. (1983) "Chromogranin A: immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormones producing endocrine glands" Life Sci. 33, 1657-1663.
- O'CONNOR D.T. und FRIGERON, R.P. (1984). "Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle protein" J. Biol. Chem. 259, 3237-3247.
- O'FARELL, P.H. (1975) "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins" J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- O'FARELL, P.Z., GOODMAN, H.M. und O'FARELL, P.H. (1977) "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins" Cell 12, 1133-1142.

- OLDEN, K., PARENT, J.B. und WHITE, S.L. (1982). "Carbohydrate moieties of Glycoproteins. A reevaluation of their function" *Biochem. Biophys. Acta* 650, 209-232.
- PALMER, F., B., St., C. und VERPOORTE, J.A. (1971) "The phosphorus components of solubilized erythrocyte membrane protein" *Can. J. Biochem.* 49, 337-347.
- PAPPENHEIMER Jr., A.M. (1977) "Diphtheria toxin" *An. Rev. Biochem.* 46, 69-94.
- PARSONS, T.F. und PIERCE, J.G. (1980). "Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: Bovine lutropin resists enzymatic deglycosylation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7089-7093.
- PAUL, J., I. und HYNES, R.O. (1984). "Multiple fibronectin subunits and their post-translational modifications" *J. Biol. Chem.* 259, 13477-13487.
- PAULSSON, M., DZIADEK, M., SUCHANEK, C. und HUTTNER, W., B. (1985). "Nature of sulphated macromolecules in mouse Reichert's membrane - Evidence for tyrosine O-sulphate in basement-membrane proteins" *Biochem. J.* 231, 571-579.
- PETERSON, T.E., ROBERTS, H.R., SOTTRUP-JENSEN, L., MAGNUSSON, S. und BAGDY, D. (1976). In *Proteids of Biological Fluids* (Peeters, H. ed.) 23, 145-149, Pergamon Press, New York.
- PORTER, M.T., FLUHARTY, A.L. und KIHARA, M. (1969). "Metachromatic leucodystrophy: Arylsulfatase A deficiency in skin fibroblast cultures" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 62, 887-891.
- RAPOPORT, T.A. (1986). "Protein translocation across and integration into membranes" *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20, 73-137.
- RIGGS, A. (1981) "Preparation of blood hemoglobin of vertebrates" *Methods Enzymol.* 76, 5-29.
- RINDI, G., BUFFA, R., SESSA, F., TORTORA, O. und solcia, E. (1986). "Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules" *J. Histochem. Cytochem. im Druck*.
- ROACH, P.J. (1984) "Protein kinases" *Methods Enzymol.* 107, 81-101.
- ROBBINS, P.W. (1962). "Sulfate-activating enzymes" *Methods Enzymol.* 5, 964-977.
- ROME, L.H., GARVIN, A.J., ALLIETTA, M.M. und NEUFELD, E.F.

(1979). "Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts" *Cell* 17, 143-153.

ROSA, P., FUMAGALLI, G., ZANINI, A. und HUTTNER, W.B. (1985a) "The major tyrosine-sulfated protein of the bovine anterior pituitary is a secretory protein present in gonadotrophs, thyrotrophs, mammotrophs and corticotrophs" *J. Cell Biol.* 100, 928-937.

ROSA, P., HILLE, A., LEE, R.W.H., ZANINI, A., DE CAMILLI, P. und HUTTNER, W.B. (1985b). "Sekretogranin I and II: Two tyrosine sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway" *J. Cell Biol.* 101, 1999-2011.

ROSA, P. und ZANINI, A. (1981) "Characterization of adenohipophyseal polypeptides by two-dimensional electrophoresis II. Sulfated and glycosylated polypeptides" *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 181-193.

ROSA, P. und ZANINI, A. (1983) "Purification of a sulfated secretory protein from the adenohipophysis. Immunochemical evidence that similar macromolecules are present in other glands" *Eur. J. Cell Biol.* 31, 94-98.

ROTHBLATT, J.A. und MEYER, D.I. (1986). "Secretion in yeast: Reconstitution of the translocation and glycosylation of 3-factor and invertase in a homologous cell-free system" *Cell* 44, 619-628.

ROTHMAN, J.E. (1985). "The compartmental organization of the Golgi apparatus" *Scientific American*, 253, 84-95.

SABATINI, D.D., KREIBICH, G., MORIMOTO, T. und ADESNIK, M. (1982) "Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles" *J. Cell Biol.* 92, 1-22.

SCHAUER, R. (1985). "Sialic acids and their role as biological masks" *Trends Biochem. Sci.* 10, 357-360.

SCHILLER, P.W., LIPTON, A., HORROBIN, D.F. und BODANSZKY, M. (1978). "Unsulfated C-terminal 7-peptide of cholecystokinin: A new ligand of the opiate receptor" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85, 1332-1338.

SCHIMKE, R.T. und BRADLEY, M.O. (1975) "Properties of protein turnover in animal cells and a possible role of turnover in "quality" control of proteins" in "Proteases and biological control" (Herausgeber Reich, E., Rifkin, D.B. und Shaw, E.) Cold Spring Harbour Conf. of Cell Proliferation, 2, 515-530.

SCHMIDT, M.F.G (1983) "Fatty acid binding: A new kind of postranslational modification of membrane proteins" *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 102, 101-129.

SCHWEITZER, E.S. und KELLY, R.B. (1985) "Selective packaging of

human growth hormone into synaptic vesicles in a rat neuronal (PC12) cell line" J. Cell Biol. 101, 667-676.

SEGEL, J.H. (1975). "Enzyme kinetics" John Wiley, New York.

SERCK-HANSEN, G. und O'CONNOR, D.T. (1984). "Immunological identification and characterization of chromogranins coded by poly(A) mRNA from bovine adrenal medulla and pituitary gland and human pheochromocytoma" J. Biol. Chem. 259, 11597-11600.

SLY, W.S. und GRUBB, J. (1979). "Isolation of fibroblasts from patients" Methods Enzymol. 58, 444-450.

SLY, W.S. und FISCHER, H.D. (1982). "The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes" J. Cellular Biochem. 18, 67-85.

SOMOGYI, P., HODGSON, A.J., DEPOTTER, R.W., FISCHER-COLBRIE, R. SCHÖBER, M., WINKLER, H. und CHUBB, I.W. (1984) "Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunological characterization, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathways" Brain Res. Rev. 8, 193-230.

SPIESS, M. und LODISH, H.F. (1986) "An internal signal sequence: the asialoglycoprotein receptor membrane anchor" Cell 44, 177-185.

STADLER, J., BORDIER, C., LOTTSPEICH, F., HENSCHEN, A. und GERISCH, G. (1982). "Improved purification and N-terminal amino acid sequence determination of the contact site A glycoprotein of Dictyostelium discoideum" Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 363, 771-776.

STENFLO, J. und SUTTIE, J.W. (1977) "Vitamin K dependent formation of γ -carboxyglutamic acid" Ann. Rev. Biochem. 46, 157-172.

STROUS, G.J.A.M. und LODISH, H.F. (1980) "Intracellular transport of secretory and membrane proteins in hepatoma cells infected by vesicular stomatitis virus" Cell 22, 709-717.

STROUS, G.J.A.M., WILLEMSSEN, R., van KERKHOF, P., SLOT, J.W., GEUZE, H.J. und LODISH, H.F. (1983). "Vesicular stomatitis virus, albumin and transferrin are transported to the cell surface via the same Golgi vesicles" J. Cell Biol. 97, 1815-1822.

TARTAKOFF, A., VASALLI, P. und DETRAZ, M. (1978). "Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins" J. Cell Biol. 79, 694-707.

TOWBIN, H., STAHELIN, T. und GORDON, J. (1979). "Electrophoretic transport of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose filters: procedure and some applications" Proc. Natl. Ac. Sci. USA 76, 4350.

- TSANG, V.C.W., PERALTA, J.M. und SIMONS, A.R. (1983). "Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis" *Methods Enzymol.* 92, 377-391.
- UNSWORTH, C.D., HUGHES, J. und MORLEY, J.S. (1982). "O-sulphated Leu-enkephalin in brain" *Nature* 295, 519-522.
- VAN LEUVEN, F. (1982). "Human α_2 -macroglobulin: structure and function" *Trends Biochem. Sci.* 7, 185-187.
- VON FIGURA, K. (1977). "Human β -N-Acetylglucosaminidase" *Eur. J. Biochem.* 80, 525-533.
- VON FIGURA, K. und HASILIK, A. (1986). "Lysosomal enzymes and their receptors" *Ann. Rev. Biochem.* 55, 167-193.
- WAGNER, J.A., KELLY, R.B. (1979). "Topological organization of proteins in an intracellular secretory organelle: The synaptic vesicle" *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 76, 4126-4130.
- WALTER, P., GILMORE, R. und BLOBEL, G. (1984). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum" *Cell* 38, 5-8.
- WATERS, M.G. und BLOBEL, G. (1986) "Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis" *J. Cell Biol.* 102, 1543-1550.
- WENZEL, S. und SUMPER, M. (1986). "Early event in sexual induction in *volvox*: Chemical modification of the extracellular matrix" *Developmental Biol.* 115, 119-128.
- WIEDENMANN, B. und FRANKE, W.W. (1985). "Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glykoprotein of M_r 38000 characteristic of presynaptic vesicles" *Cell* 41, 1017-1028.
- WILCHEK, M., MIRON, T. und KOHN, J. (1984). "Affinity chromatography" *Methods Enzymol.* 104, 3-55.
- WINKLER, H. und WESTHEAD, E. (1980) "The molecular organization of adrenal chromaffin granules" *Neuroscience* 5, 65-80.
- WOLD, F. (1981). "In vivo chemical modification of proteins" *Ann. Rev. Biochem.* 50, 783-814.
- WOLD, F. und MOLDAVE, K. (1984) "Posttranslational Modifikations" *Methods Enzymol.* 106, XIII-XVI.
- YOUNG, R.W. (1973). "The role of the Golgi complex in sulfate metabolism" *J. Cell Biol.* 57, 175-189.
- ZANINI, A., GIANNATTASIO, G., NUSSDORFER, G., MARGOLIS, R.K., MARGOLIS, R.U. und MELDOLESI, J. (1980). "Molecular organization of prolactin granules II. Characterization of glucosaminoglycans and glycoproteins of the bovine prolactin matrix". *J. Cell Biol.* 86, 260-272.

Danksagungen

Dr. W. Huttner danke ich für den Vorschlag des Themas, für unzählige anregende Diskussionen, großzügige Ausstattung des Arbeitsplatzes und uneingeschränkte Unterstützung von Diskussionen und Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen.

Herrn Prof. Thoenen danke ich für die Betreuung meiner Arbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried.

Herrn Prof. Linzen danke ich für die Betreuung meiner Arbeit als Vertreter der Fakultät für Biologie.

Allen Kollegen im Labor danke ich für die gute Zusammenarbeit, besonders Dr.R.Lee für die Einweisung in wichtige Arbeitstechniken und Dr.P.Rosa für die intensive Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Sekretogranine.

Frau H. Thorun danke ich für die Einweisung in das Arbeiten mit Zellkulturen und Frau U. Holzer für technische Hilfe beim Testen von Antiseren.

Herrn Prof.v.Figura und Herrn Dr. Braulke (Münster) danke ich für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung lysosomaler Enzyme.

Allen Mitarbeitern der Institutswerkstätten, des Tierhauses und des Fotolabors danke ich für technische Hilfe.

Meinem Vater und Jella Fischer danke ich für hilfreiche Kritik bei der Anfertigung des Manuskripts.

LebenslaufPersönliche Daten:

Annette Hille

geboren am 3.11.1956 in Würzburg

deutsch, ledig

Schulausbildung:

1963-1975 Schulbesuch in Freiburg/Br.

1975 Abitur am Berthold-Gymnasium, Freiburg

Studium:

1975-1981 Studium der Biologie an der Universität Freiburg

1977 Diplombiologie-Vorprüfung, erweitert durch die Staatsexamensvorprüfung
für das Lehramt Chemie

1977-1980 Aufbaustudium in den Fächern Biochemie, Zoologie, Limnologie und organische Chemie

1980 Diplom-Hauptprüfung

1981 Diplomarbeit bei Prof. J. Ebel, Institut für Biologie II, Freiburg

Thema: "Elicitorstimulierte Enzyme der Phytoalexinsynthese"

1982 Untersuchungen zur Anreicherung und Charakterisierung von Sialyltransferasen bei
Prof. Brossmer, Institut für Biochemie II, Universität Heidelberg

1983-1985 Promotionsstudium an der Universität München

1983 Beginn der Promotionsarbeit in der Nachwuchsgruppe von Dr. Huttner, MPI für
Psychiatrie (Abt. Neurochemie), Martinsried. Thema: "Untersuchungen zur Sekretion
und Kompartimentierung tyrosinsulfatierter Proteine"

Juni 1984 Teilnahme am EMBO-Kurs "Fractionation of tissue culture cells" am EMBL, Heidelberg

Sept. 1985 Umzug mit der Arbeitsgruppe von Dr. Huttner an das EMBL in Heidelberg,
Fortsetzung der Promotion

Sept. 1986 Assistent beim EMBO-Kurs "Post-Translational Modifications" am EMBL, Heidelberg

